EINFLUSS VON CYCLODEXTRINEN AUF DIE NITROSIERUNG VON ARZNEISTOFFEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Volker Wedelich
aus Berlin
1985

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

EINFLUSS VON CYCLODEXTRINEN AUF DIE NITROSIERUNG VON ARZNEISTOFFEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Volker Wedelich
aus Berlin
1985

1. Referent: Prof. Dr. K.-H. Frömming

2. Referent: Prof. Dr. H. Fenner

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.1985

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming danke ich für das Überlassen des Themas, für seine stets freundliche Hilfe und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion aller Probleme, die sich im Zusammenhang mit der Arbeit ergaben.

Herrn Dr. W. Mehnert danke ich für die ständige Bereitschaft zur Diskussion angefallener Probleme.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0014

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		11
1.	EINLEITUNG	12
1.1.	Die Struktur der Cyclodextrine	12
1.2.	Cyclodextrine als Komplexbildner	14
1.3.	Pharmazeutische Verwendungsmöglichkeiten	16
1.4.	Cyclodextrine als Enzymmodelle	20
1.5.	Problemstellung	22
2.	ALLGEMEINER TEIL	24
2.1.	Allgemeines über N-Nitrosoverbindungen	24
2.1.1.	Biologische Wirkung	24
2.1.2.	Chemie der N-Nitrosierung	26
2.1.2.1.	Katalysatoren	28
2.1.2.2.	Inhibitoren	28
2.1.3.	N-Nitrosierung von Arzneistoffen	29
2.1.4.	Endogene N-Nitrosierung	30
2.1.5.	Der NAP-Test	32
2.2.	Die verwendeten Cyclodextrine und Arzneistoffe	34
2.2.1.	Die Cyclodextrine	34
2.2.2.	Die Arzneistoffe	34
2.2.2.1.	Die Auswahlkriterien	34

		Seite
2.2.2.2.	Piperazin	36
2.2.2.3.	Ethambutol	36
2.2.2.4.	Cimetidin	37
2.2.2.5.	Ephedrin	38
2.2.2.6.	Mefenorex	38
2.2.2.7.	Fencamfamin	39
2.3.	NMR-Methoden	40
2.3.1.	Der Komplexbildungsnachweis mittels ^{1}H-NMR	40
2.3.2.	Die Bestimmung der molaren Zusammensetzung eines Cyclodextrin-Addukts aus der ^{1}H-NMR-Integrationskurve	46
2.4.	Die Verfahrensweise bei der Nitrosierung	47
2.4.1.	Die Reaktionsbedingungen	47
2.4.2.	Die Nitrosierung in Anwesenheit von Cyclodextrin	48
2.4.3.	Der Reaktionsansatz	50
2.4.4.	Die Methode der quantitativen Bestimmung	51
2.5.	Piperazin	52
2.5.1.	Piperazin-ß-Cyclodextrin-Addukt	53
2.5.1.1.	Bestimmung der molaren Zusammensetzung	54
2.5.1.2.	Röntgendiffraktometrische Untersuchung	55
2.5.2.	NMR-Untersuchungen	59
2.5.3.	Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Piperazin	62
2.5.4.	Einfluß von ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Piperazin bei pH 5	64

		Seite
2.6.	Ethambutol	67
2.6.1.	Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Ethambutol	69
2.7.	Cimetidin	69
2.7.1.	Nitrosierung von Cimetidin in der Küvette	69
2.7.2.	Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Cimetidin	70
2.8.	Ephedrin	72
2.8.1.	NMR-Untersuchungen	72
2.8.2.	Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Ephedrin	75
2.8.3.	Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin	77
2.8.3.1.	NMR-Untersuchungen	80
2.8.3.2.	Einfluß von Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Ephedrin	81
2.8.4.	Reaktionskinetische Betrachtungen	83
2.8.5.	Diskussion	88
2.8.6.	NMR-Untersuchung des N-Nitrosoephedrin-ß-Cyclodextrin-Addukts	90
2.8.7.	Vergleich der Bildungskonstanten der ß-Cyclodextrin-Komplexe des Ephedrins und des N-Nitrosoephedrins	93
2.8.7.1.	NMR-Untersuchung des Ephedrin-ß-Cyclodextrin-Systems	95
2.8.7.2.	NMR-Untersuchung des N-Nitrosoephedrin-ß-Cyclodextrin-Systems	97
2.8.7.3.	Diskussion	99

		Seite
2.9.	Mefenorex	102
2.9.1.	NMR-Untersuchungen	102
2.9.2.	Einfluß von α-, ß-, γ- und Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Mefenorex	105
2.9.3.	NMR-Untersuchung des N-Nitrosomefenorex-ß-Cyclodextrin-Addukts	107
2.9.4.	NMR-Untersuchung des N-Nitrosomefenorex-γ-Cyclodextrin-Addukts	109
2.10.	Fencamfamin	110
2.10.1.	Löslichkeit des ß-Cyclodextrins in Anwesenheit von Fencamfamin	110
2.10.2.	NMR-Untersuchungen	111
2.10.3.	Einfluß von α-, ß-, γ- und Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Fencamfamin	114
2.10.4.	NMR-Untersuchung des N-Nitrosofencamfamin-γ-Cyclodextrin-Addukts	117
2.11.	Zusammenfassende Diskussion	119
3.	EXPERIMENTELLER TEIL	124
3.1.	Substanzen	124
3.1.1.	Cyclodextrine	124
3.1.2.	Arzneistoffe	124
3.1.3.	Sonstige Substanzen	125

		Seite
3.2.	Physikalische und physikalisch-chemische Methoden	125
3.2.1.	Schmelzpunktbestimmungen	125
3.2.2.	pH-Messungen	125
3.2.3.	Röntgenbeugungsaufnahmen	126
3.2.4.	Kernresonanzmessungen	126
3.3.	Darstellungen	126
3.3.1.	Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin	126
3.3.2.	N-Nitrosoephedrin	127
3.3.3.	Piperazin-ß-Cyclodextrin-Addukt	128
3.4.	Stammlösungen für die Nitrosierungen	130
3.5.	Durchführung und Analytik der Nitrosierungen	131
3.5.1.	Piperazin, Ethambutol, L-Ephedrin, Mefenorex und Fencamfamin	131
3.5.2.	Cimetidin	133
3.6.	Statistische Prüfungen	134
4.	LITERATURVERZEICHNIS	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Für die in dieser Arbeit verwendeten bzw. mehrfach angesprochenen Cyclodextrine, Arzneistoffe und N-Nitrosoverbindungen werden die nachstehenden Abkürzungen benutzt.

α-CD = α-Cyclodextrin
ß-CD = ß-Cyclodextrin
γ-CD = γ-Cyclodextrin
DIMEB = Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin

PIP = Piperazin

ETB = Ethambutol

CIM = Cimetidin
NCIM = N-Nitrosocimetidin

EPH = Ephedrin
NEPH = N-Nitrosoephedrin

MEF = Mefenorex
NMEF = N-Nitrosomefenorex

FEN = Fencamfamin
NFEN = N-Nitrosofencamfamin

NDMA = N-Nitrosodimethylamin
NDEA = N-Nitrosodiethylamin

1. EINLEITUNG

1.1. Die Struktur der Cyclodextrine

Die Cyclodextrine (CD) sind eine Reihe von homologen Oligosacchariden, die beim enzymatischen Abbau der Stärke durch eine Amylase des Bacillus macerans anfallen. Besonders in älterer Literatur werden sie auch als Schardinger-Dextrine, d.h. nach dem Autor ihrer ersten ausführlichen Charakterisierungen, bezeichnet. FREUDENBERG und MEYER-DELIUS (1) beschrieben den Aufbau aus α-1,4-ringverknüpften D-Glucoseeinheiten. In Abhängigkeit von der Zahl (n) der an einem Ringaufbau beteiligten Glucoseeinheiten existieren verschiedene CD-Typen. Nachstehend sind die drei einfachsten CD mit ihrem Innendurchmesser (2) aufgeführt.

Glucoseeinheiten n	Name	Innendurchmesser nm
6	α-Cyclodextrin	0,6
7	ß-Cyclodextrin	0,75
8	γ-Cyclodextrin	0,9 - 1,0

Bei der Gewinnung von CD aus Stärke erhält man ein Gemisch, das hauptsächlich aus diesen drei Komponenten besteht. Niedrigere Homologe werden nicht, höhere nur in geringen Mengen gebildet.

Kernresonanzmagnetische (NMR-) und röntgendiffraktometrische Studien ergaben die C1-Sessel-Konformation der

Glucosemoleküle (3). Infolgedessen besitzen die CD eine bestimmte sterische Struktur, wie sie in Abb. 1 für das ß-CD dargestellt ist.

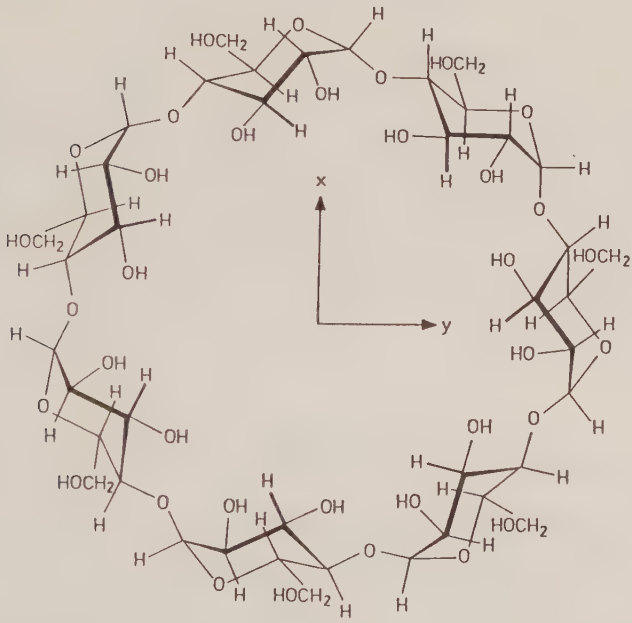


Abb. 1: Das ß-Cyclodextrin-Molekül

Die kranzförmigen Moleküle liegen stets in einer leicht konischen Form vor, deren enge Öffnung die primären Hydroxylgruppen enthält, während die weitere Öffnung von den sekundären Hydroxylgruppen besetzt ist. Zwischen den sekundären

Hydroxylgruppen benachbarter Glucoseeinheiten bestehen intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen, welche die Form der CD-Moleküle stabilisieren (4).

Die vielen Hydroxylgruppen auf der äußeren Oberfläche verleihen den CD ihre gute Wasserlöslichkeit. Bei Raumtemperatur wurden die folgenden Werte ermittelt (5): 14,5 g α-CD/100 ml, 1,85 g ß-CD/100 ml und 23,2 g γ-CD/100 ml.

Die dem Mittelpunkt der Ringmoleküle zugewandte Oberfläche besteht hingegen nur aus Kohlenstoff-Kohlenstoff-, Kohlenstoff-Wasserstoff- und glykosidischen Sauerstoffbrücken. Daher ist der Hohlraum jedes CD-Moleküls durch einen relativ hydrophoben Charakter und durch eine hohe Elektronendichte gekennzeichnet.

1.2. Cyclodextrine als Komplexbildner

Die bedeutsamste Eigenschaft der CD ist ihre Fähigkeit, mit geeigneten Molekülen Einschlußverbindungen zu bilden. Das wesentliche Merkmal solcher Komplexe ist die rein räumliche Verbindung zweier Komponenten, oft als Wirt und Gast bezeichnet. Kovalente Bindungen werden dabei nicht hergestellt. Nähere Ausführungen über den besonderen Charakter und die verschiedenen Klassen von Einschlußverbindungen, einschließlich der CD, finden sich bei SCHLENK (6,7) und CRAMER (2,8,9).

Die entscheidende Voraussetzung für die Bildung einer CD-Einschlußverbindung ist die richtige Größe des einzu-

schließenden Gastmoleküls. Dieses muß so in den Hohlraum hineinpassen, daß es ihn gut auszufüllen vermag. Größere Moleküle, als es der Dimension des Hohlraums entspricht, können nur teilweise eingeschlossen werden. Dazu müssen sie über wenigstens ein in den Hohlraum passendes Strukturelement verfügen.

Während andere Inklusionstypen beim Auflösen zerfallen, existieren CD-Einschlußverbindungen auch im gelösten Zustand. Das Molverhältnis zwischen CD und eingeschlossener Gastkomponente beträgt dann gewöhnlich 1:1. Zwischen dem gelösten Komplex und den dissoziierten Bestandteilen stellt sich ein Gleichgewicht ein, das durch die Dissoziationskonstante K_D beschrieben wird:

$$\text{CD-Komplex} \rightleftharpoons \text{CD} + \text{Substrat}$$

$$K_D = \frac{[CD] \cdot [S]}{[CD \cdot S]} \text{ [mol/l]}$$

Als treibende Kraft der Komplexbildung wird heute die Summe mehrerer gleichzeitig auftretender molekularer Wechselwirkungen angesehen, die je nach Substrat verschieden stark beteiligt sind:

1. Van-der-Waals-Wechselwirkungen, vor allem bei polaren und leicht polarisierbaren Substraten (10,11);
2. hydrophobe Wechselwirkungen, vor allem beim Einschluß unpolarer Substrate (12,13);

3. Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substrat und (vorzugsweise) den primären Hydroxylgruppen (14,15,16).

Beim Überschreiten der Sättigungskonzentration kristallisiert der überschüssige Anteil des CD-Komplexes als feste Einschlußverbindung. Dabei ist das Kristallgitter (Kanal- oder Käfigstruktur (17)) auch dann stabil, wenn die Hohlräume nur teilweise gefüllt sind (2). Systematische Untersuchungen von CRAMER und HENGLEIN (18) an Einschlüssen von 54 Gastkomponenten in α-, ß- und γ-CD ergaben, daß CD-Addukte zwar selten stöchiometrisch aber immer konstant zusammengesetzt kristallisieren. Das Auftreten des letztgenannten Merkmals bei einem unbekannten CD-Addukt deutet daher auf einen echten Einschluß hin.

1.3. Pharmazeutische Verwendungsmöglichkeiten

Als Gastmolekül einer CD-Einschlußverbindung zeigen viele pharmazeutisch interessante Substanzen vorteilhaft veränderte physikalische und chemische Eigenschaften. So sind leicht flüchtige oder empfindliche Wirk- und Aromastoffe als feste CD-Addukte meist derartig stabil, daß sie problemlos gelagert oder industriell verarbeitet werden können. Die Kohlenhydrat-Natur der CD erschließt dieser Stoffgruppe ein breites Anwendungsgebiet im Bereich der Arznei- und Nahrungsmittelherstellung (19,20).

Tests an Tieren haben ergeben, daß per os verabreichtes ß-CD toxikologisch unbedenklich ist (21) und nicht aus dem Verdauungstrakt resorbiert wird (22). Eine schädigende, und zwar nephrotoxische, Wirkung wurde nur nach der intravenösen und subcutanen Gabe hoher Dosen von ß-CD beobachtet (23).

Das Interesse der pharmazeutischen Wissenschaften an den CD hat mit der Zahl derjenigen Arzneistoffe, von denen eine CD-Komplexbildung beschrieben wurde, in den letzten Jahren stark zugenommen. Über die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten der CD und ihrer Einschlußverbindungen in diesem Bereich ist von FRÖMMING (24,25), SZEJTLI (26,27), SAENGER (19), UEKAMA (28) und JONES et al. (29) zusammenfassend berichtet worden.

Für die Pharmazeutische Technologie stehen im wesentlichen drei Aspekte im Vordergrund:

1.) Stabilisierung empfindlicher Substanzen

Da der Einschluß einer molekularen Verkapselung entspricht, können äußere Einflüsse vom Gastmolekül ferngehalten werden. Die nachstehenden Verbindungen erwiesen sich im CD-Komplex als weitgehend geschützt vor hydrolytischer (A), oxidativer (B), photochemischer (C) Zersetzung oder Dehydratisierung (D):

A) Benzocain (30), Procain, Atropin, Acetylsalicylsäure (31), Prostacyclin (PGI_2)(32), Digoxin (33), Bencyclan (34), Metronidazolbenzoat (35);

B) Linolsäure, Chaulmoograsäureethylester, Ascaridol (36), ungesättigte Fettsäuren (37), Vitamin D_3 (38);

C) Benzaldehyd (39), Clofibrat (40), Metronidazolbenzoat (35), Vitamin D_3 (38);
D) 16,16-Dimethyl-trans-Δ^2-prostaglandin-E_1-methylester (41), Prostaglandin E_1 (42) und E_2 (26,43).

2.) Erhöhung der Löslichkeit

CD-Addukte können mit einer Reihe schwerlöslicher hydrophober Arzneistoffe gebildet werden. Die Gastverbindung befindet sich dann innerhalb einer nach außen hin hydrophilen "Verpackung" im molekulardispersen Zustand. Daraus resultiert meist eine wesentlich bessere Löslichkeit und Lösungsgeschwindigkeit als sie der Arzneistoff allein besitzt. Als Beispiele für Arzneistoffe, deren Löslichkeit durch Überführung in ein CD-Addukt deutlich gesteigert werden kann, seien angeführt:

Salicylsäure, Menadion, Phenobarbital (44), Vitamin D_3 (38), Indometacin (45), Progesteron (46), Clofibrat (40), Spironolacton (47), Diazepam (48), Phenacetin (49), Digoxin (50), Cinnarizin (51), Prostaglandin E_1 (42) und $F_{2\alpha}$ (52).

3.) Erhöhung der Resorptionsrate

Werden schlecht lösliche Arzneistoffe in Form ihrer festen CD-Addukte verabreicht, so ist in den meisten Fällen eine verstärkte Resorption festzustellen. Dieser Effekt erklärt sich aus der oben genannten Löslichkeits- und Freisetzungsverbesserung. Die erhöhte Bioverfügbarkeit in Anwesenheit von CD könnte im Sinne einer Dosisreduzierung nutzbar gemacht werden. Signifikant erhöhte

Resorptionswerte wurden sowohl beim Menschen (A) als auch bei Tieren (B) festgestellt. Als Beispiele sind hier die CD-Addukte folgender Arzneistoffe zu nennen:

A) Salicylsäure (53), Furosemid (54);
B) Ibuprofen, Ketoprofen (55), Indometacin (45), Phenobarbital (56), Spironolacton (47), Vitamin D_3 (57), Diazepam (48) und Digoxin (50).

Daneben sind in der Literatur noch einige weitere technologisch interessante Eigenschaften von CD-Addukten mitgeteilt.

FRÖMMING et al. (36) konnten zeigen, daß feste CD-Addukte ohne größere Vorsichtsmaßnahmen auch zu Tabletten verarbeitet werden können. Kompressionsdrucke, wie sie in gewöhnlichen Tablettenmaschinen auftreten, wirkten sich nicht negativ auf die Adduktstabilität aus.

Organoleptische Vorteile ergaben sich durch die Überführung von Clofibrat (40) und Femoxetin (58) in feste CD-Einschlüsse.

Auch von Schutzeffekten der CD gegenüber biologischen Membranen wird berichtet. Es wurde festgestellt, daß durch die Komplexbildung die Chlorpromazin-induzierte Hämolyse (59) sowie die magenwandreizende Wirkung des Phenylbutazons (60) und der Salicylsäure (61) vermindert werden.

1.4. Cyclodextrine als Enzymmodelle

Während der feste Zustand einer CD-Einschlußverbindung immer mit einer Stabilisierung der eingeschlossenen Gastkomponente verbunden ist, treten in Lösung auch entgegengesetzte Effekte auf. So werden racemische Mandelsäureester in Gegenwart von CD schneller hydrolysiert als in deren Abwesenheit, wobei es außerdem zu einer Anreicherung einer der beiden Enantiomeren kommt (62). CD können also als spezifische Katalysatoren wirken.

Schon CRAMER (2) bemerkte auffällige Parallelen zwischen einem Gastmolekül-CD-Komplex und den "Schlüssel-Schloß-Beziehungen" biochemischer Reaktionen. Auch bei der Katalyse durch CD geht der chemischen Umwandlung stets die Bildung eines Molekülkomplexes voraus. Dieser Prozeß ist identisch mit dem der enzymatischen Katalyse. Somit eignen sich die CD als Enzymmodelle (63,64). Ihr lipophiler Hohlraum kann den lipophilen Teil eines Substrates binden, während die Hydroxylgruppen auf der Außenseite des Ringmoleküls für Wechselwirkungen mit dem herausragenden Teil des Substrates zur Verfügung stehen.

In der Literatur sind viele chemische Reaktionen beschrieben, die in Anwesenheit von CD beschleunigt verlaufen. Eine umfassende Darstellung dieser Thematik wurde von BENDER und KOMIYAMA (65) erbracht. Beispiele für CD-katalysierte Reaktionen sind Decarboxylierungen substituierter Acetessigsäuren und Trihalogenessigsäuren (15) sowie die Oxidation von

α-Hydroxyketonen zu α-Diketonen (66) und die Abspaltung von Salzsäure aus dem Insektizid Trichlorphon (26). Besonders eingehend untersucht wurde die CD-katalysierte Hydrolyse der Phenylester (10,67) und Acetanilide (68), da die analoge enzymatische Spaltung aromatischer Ester und Amide durch Chymotrypsin sehr gut erforscht ist.

Bei der Katalyse durch CD konnten die für enzymatische Vorgänge charakteristischen Erscheinungen der Sättigung (10, 69) und der kompetitiven Hemmung (10,70) hervorgerufen werden.

CD können auch als Katalysatoren für selektive chemische Synthesen herangezogen werden. Hierbei wird ausgenutzt, daß die Geometrie eines Substrat-Moleküls nur bestimmte Möglichkeiten der räumlichen Komplexbildung zulassen kann. Beispielsweise orientiert sich das Gastmolekül im Phenol-ß-CD-Komplex vorzugsweise in axialer Richtung. Dieser Effekt ist noch ausgeprägter in alkalischer Lösung, da dann das Phenolat vorliegt, dessen polare Seite gegenüber der apolaren Seite eine noch geringere Tendenz zum Einschluß zeigt. In einem solchen Komplex sind die ortho- und meta-Positionen des Gastmoleküls durch die CD-Hülle vor einem chemischen Angriff geschützt, während die para-Stellung zugänglich ist. Auf diese Weise gelangen die selektiven Synthesen von p-Hydroxybenzaldehyd (71) und p-Hydroxybenzoesäure (72) aus Phenol und Chloroform bzw. Tetrachlorkohlenstoff mit ß-CD als Katalysator.

1.5. Problemstellung

Angesichts der vielfältigen Effekte der CD tauchte die Frage auf, ob die N-Nitrosierbarkeit bestimmter Arzneistoffe verändert wird, wenn sie in CD-Einschlußverbindungen überführt werden. Bisher sind keine derartigen Untersuchungen bekannt.

Theoretisch können potentiell carcinogene N-Nitrosoverbindungen aus allen Substanzen mit nitrosierbaren Aminogruppen gebildet werden. Viele der heute gebräuchlichen Arzneistoffe gehören chemisch den sekundären oder den tertiären Aminen an. Die meisten dieser Verbindungen sind nur in geringem Maße nitrosierbar, einige können jedoch sehr leicht zum N-Nitrosoprodukt reagieren (73). Wenn derartige Arzneistoffe in den menschlichen Verdauungstrakt gelangen, können sie dort Bedingungen vorfinden, die für eine N-Nitrosierung günstig sind. Dann besteht die Gefahr einer Carcinogenese.

Es wäre möglich, daß sich eine solche Gesundheitsgefährdung vermeiden oder wenigstens verringern ließe, wenn die betreffenden Arzneistoffe als CD-Einschlußverbindungen appliziert würden.

Andererseits könnten die CD auch einen katalytischen Einfluß auf die N-Nitrosierung von Arzneistoffen haben. In diesem Fall bestünden bisher nicht erkannte risikobehaftete Wechselwirkungen zwischen bestimmten nitrosierbaren Verbindungen und den CD.

Eine der Aufgaben des pharmazeutischen Technologen ist es, Arzneimittel nach Möglichkeit so zu formulieren, daß nachteilige Arzneistoff/Hilfsstoff-Wechselwirkungen vermieden werden. Die für die Zukunft zu erwartende zunehmende Verwendung der CD als pharmazeutische Hilfsstoffe verlangt daher genaue Kenntnisse über deren Wechselwirkungspotential.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, etwaige Einflüsse der CD auf die N-Nitrosierung von Arzneistoffen zu untersuchen.

Die Durchführung der Versuche soll in Anlehnung an den NAP-Test der WHO erfolgen. Bei diesem handelt es sich um einen In-vitro-Test, der als Referenzverfahren zur vergleichenden Beurteilung der N-Nitrosierbarkeit verschiedener Arzneistoffe dient.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Allgemeines über N-Nitrosoverbindungen

2.1.1. Biologische Wirkung

Die bekannteste N-Nitrosoverbindung ist das sehr einfach gebaute N-Nitrosodimethylamin (NDMA). Diese Substanz rückte in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses, als BARNES und MAGEE im Tierversuch zunächst deren starke Lebertoxizität (74) und wenig später eine unerwartet starke lebercarcinogene Wirkung (75) entdeckten. Das nächsthöhere Homologe, N-Nitrosodiethylamin (NDEA), erwies sich ebenfalls als stark lebercarcinogen (76,77). Als sich zeigte, daß nicht nur Nitrosamine, sondern auch Nitrosamide, wie N-Nitrosomethylharnstoff (78), stark carcinogen sind, geriet die gesamte Stoffgruppe der N-Nitrosoverbindungen in den Verdacht, auch beim Menschen krebsauslösend zu sein.

Die carcinogenen Wirkungen von 65 verschiedenen N-Nitrosoverbindungen an Ratten wurden 1967 von DRUCKREY, PREUSSMANN, IVANKOVIC und SCHMÄHL (79) beschrieben. Nach Schätzung mehrerer Autoren (80) sind inzwischen einige Hundert N-Nitrosoverbindungen tierexperimentell geprüft worden. Die große Mehrzahl erwies sich in einer oder mehreren Arten und oft in mehr als einem Organ als carcinogen. Daraus folgt, daß jede noch nicht biologisch geprüfte N-Nitrosoverbindung bis zum Beweis des Gegenteils als potentielles Carcinogen angesehen werden muß. So befindet sich diese Stoffgruppe weiterhin in

intensiver wissenschaftlicher Bearbeitung. Es interessieren hauptsächlich die krebserzeugenden Wirkungen, aber auch mutagene Eigenschaften werden häufig beobachtet.

Die biologische Aktivität einer N-Nitrosoverbindung hängt eng mit ihrer chemischen Reaktivität zusammen. Im Gegensatz zu Nitrosaminen sind Nitrosamide meist sehr instabil. Nitrosamide zerfallen im Organismus spontan in alkylierende Agentien, während Nitrosamine nach heutigen Vorstellungen erst im Organismus enzymatisch zu proximalen Carcinogenen aktiviert werden, die dann ihrerseits in die alkylierenden Wirkformen zerfallen. Demzufolge können Nitrosamide bereits lokal an der Applikationsstelle eine Krebserkrankung hervorrufen. Hingegen sind von Nitrosaminen wegen der erforderlichen metabolischen Aktivierung nur systemische Wirkungen zu erwarten.

Im Hinblick auf die Untersuchungen mit Cimetidin (CIM) sei hinzugefügt, daß N-Nitrosoderivate auch von Guanidinen gebildet werden können. N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin ist beim Versuchstier ein potentes Carcinogen (81). Die chemische Ähnlichkeit dieser Substanz mit einer Teilstruktur des N-Nitrosocimetidins (NCIM) hat Verdachtsmomente gegen das CIM hervorgebracht. In vitro wirkt NCIM mutagen (82) und induziert DNS-Brüche (83). Carcinogene Effekte wurden jedoch auch nach extensiver oraler NCIM-Verabreichung am Tier bisher nicht beobachtet (84).

Noch gibt es keinen direkten Beweis dafür, daß N-Nitrosoverbindungen für Krebsfälle beim Menschen verantwortlich sind. Jedoch wird am Beispiel des NDMA deutlich, wie extrem unwahr-

scheinlich eine absolute Ausnahme ist. In einer Untersuchung von SCHMÄHL und HABS (85) war NDMA für alle der 22 getesteten Tierarten, vom Fisch bis zu höheren Primaten, ein Carcinogen.

2.1.2. Chemie der N-Nitrosierung

Die Bildung von Nitrosaminen aus sekundären Aminen und Nitrit bei saurem pH läßt sich nach folgender summarischer Reaktionsgleichung beschreiben:

Die eigentlichen chemischen Reaktionsabläufe sind jedoch weit komplizierter. Ausführliche Daten zur Chemie und Kinetik der N-Nitrosierungsreaktion hat MIRVISH (86) gegeben.

Die meisten sekundären Amine werden in wässrig-saurer Lösung nach folgendem Schema nitrosiert:

Der Reaktionsablauf beginnt gewöhnlich mit der Umwandlung des Nitrits in Salpetrige Säure (pK_a 3,4). Dies erklärt, weshalb die N-Nitrosierung durch Säure katalysiert wird. Aus zwei Molekülen undissoziierter HNO_2 entsteht das eigentliche nitrosierende Agens N_2O_3. Demnach ist die Reaktionsgeschwindigkeit dem Quadrat der Nitritkonzentration proportional. Doch nur das unprotonierte Amin wird vom N_2O_3 angegriffen.

Es resultiert eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit der Nitrosierungsgeschwindigkeit. Niedrige pH-Werte begünstigen die Bildung von N_2O_3, aber reduzieren die Konzentration an freiem Amin. Das Zusammenspiel dieser beiden gegenläufigen Mechanismen führt dazu, daß die sekundären Amine ihr Nitrosierungsoptimum bei einem bestimmten pH-Wert, gewöhnlich pH 3 - 4, haben.

Hinzu kommt ein starker Einfluß der Basizität des Amins. Es wird umso leichter zu nitrosieren sein, je niedriger sein pK_a-Wert ist. So reagiert beispielsweise das schwach basische Piperazin (PIP)(pK_a 5,6) etwa 200 000 fach schneller zum N-Nitrosoprodukt als das stark basische Piperidin (pK_a 11,2).

Die Geschwindigkeit der Nitrosierung von Amiden zeigt dagegen kein pH-Optimum. Im Bereich von pH 3 nach pH 1 nimmt sie bei Erniedrigung des pH-Wertes um jeweils eine Einheit um den Faktor 10 zu (87). Ganz entsprechend verhält sich das CIM, dessen Nitrosierungsgeschwindigkeit in vitro mit steigendem pH-Wert sehr stark abnimmt. Nach einstündiger Reaktion wurden bei pH 1,00 über 42% und bei pH 4,01 nur 0,15% NCIM gebildet (88).

Außer sekundären Aminen können auch tertiäre Amine zu Nitrosaminen umgesetzt werden. Dieser Reaktionsweg wird als desalkylierende Nitrosierung bezeichnet (89). Häufig werden dabei die flüchtigen Nitrosamine NDMA oder NDEA abgespalten (86). Die Geschwindigkeit dieser Reaktion, die bevorzugt im schwach sauren Medium (pH 3 - 6) abläuft, ist im Normal-

fall allerdings wesentlich kleiner als die Nitrosaminbildung aus sekundären Aminen (87).

2.1.2.1. Katalysatoren

N-Nitrosierungsreaktionen können durch viele anorganische und organische Substanzen stark beschleunigt werden (84). Von ihnen seien hier nur die wichtigsten, wie Halogenide, Thiocyanat, Aldehyde und Phenole, erwähnt. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist besonders interessant, daß auch mizellbildende oberfächenaktive Stoffe, wie Lecithin, die Nitrosierungsrate stark erhöhen können, vermutlich durch Anreicherung der Reaktionspartner an bzw. in den Mizellen (90).

2.1.2.2. Inhibitoren

Es gibt mehrere Stoffe, die mit Aminen um das nitrosierende Agens konkurrieren und auf diese Weise die Nitrosaminbildung wirksam verringern können. Einer der stärksten Hemmstoffe ist Ascorbinsäure (91). In einer radikalischen Reaktion zwischen Ascorbinsäure und dem Nitrosierungsmittel N_2O_3 entstehen zwei Moleküle Stickstoffmonoxid (NO) und Dehydroascorbinsäure (92). NO ist im Gegensatz zu N_2O_3 kein nitrosierendes Agens.

Ein weiterer Stoff, der die N-Nitrosierung wirksam hemmt,

ist α-Tocopherol (93). Auch eine Reihe anderer Verbindungen, wie beispielsweise Aminosäuren, Thiole, Gallate und Harnstoff, reduzieren die Nitrosaminbildung indem sie das Nitrosierungsmittel abfangen (84). Obwohl viele von ihnen normale Bestandteile der menschlichen Nahrung sind, darf das Risiko einer endogenen Nitrosierung (siehe 2.1.4.) nicht unterschätzt werden. Immer wieder zeigen Tierexperimente, wie häufig N-Nitrosierungen in vivo vorkommen.

2.1.3. N-Nitrosierung von Arzneistoffen

Viele Arzneistoffe enthalten sekundäre oder tertiäre Aminofunktionen oder Amidogruppen, die nitrosiert werden können, wenn sie im sauren Medium in Kontakt mit Nitrit kommen. Der erste Nachweis einer solchen Arzneistoff-Nitrosierung wurde von LIJINSKI et al. (94) im Jahre 1972 erbracht. Zunächst wurde die Bildung der entsprechenden Nitrosamine nur anhand weniger Verbindungen demonstriert. Von ihnen erwies sich Aminophenazon als am leichtesten nitrosierbar. Es bildet in hoher Ausbeute das stark carcinogene NDMA. In der Folge sind diese Untersuchungen auf eine Vielzahl weiterer Arzneistoffe ausgedehnt worden. Ein detaillierter Überblick wurde von MIRVISH (86) veröffentlicht.

2.1.4. Endogene N-Nitrosierung

Die relativ leichte Entstehung von N-Nitrosoverbindungen hat schon kurz nach Entdeckung der Carcinogenität dieser Substanzen den Gedanken nahegelegt, daß auch der lebende Organismus als Syntheseort in Frage kommt. Besonders im menschlichen Magen müßten günstige Voraussetzungen für diese endogene N-Nitrosierung bestehen, da sich der pH-Wert des Mageninhalts im Verlauf der Verdauung zwischen etwa pH 1,5 und 5 bewegt (95).

DRUCKREY et al. (96) vermuteten die Entstehung von Nitrosaminen im sauren Milieu des Magens aus sekundären Aminen und Salpetriger Säure. Jedoch hatte die gleichzeitige Verfütterung von Diethylamin und Nitrit an 67 Ratten keine carcinogenen Wirkungen zur Folge, was die Autoren darauf zurückführten, daß im Magen ihrer Ratten pH-Werte unter 4 nicht auftraten.

Später zeigten SANDER, SCHWEINSBERG und MENZ (97), welchen großen Einfluß die Basizität der Amine darauf hat, in welchem Umfang Nitrosamine aus sekundären Aminen synthetisiert werden können. Diese Autoren induzierten Tumore des Oesophagus in Ratten durch Verfütterung von Natriumnitrit und dem schwach basischen N-Methylbenzylamin. Die einfachen Dialkylamine mit hohem pK_a-Wert lassen sich wesentlich schwerer nitrosieren als die aromatischen sekundären Amine mit niedrigem pK_a-Wert. Deshalb waren die Experimente mit Diethylamin negativ verlaufen.

Auch eine Reihe von Arzneistoffen ist zusammen mit Nitrit im Kombinationsversuch am Tier geprüft worden. Unter diesen Bedingungen waren PIP (98), Ethambutol (ETB)(99) und Ephedrin (EPH)(100) carcinogen.

Die endogene Bildung von carcinogenen Nitrosaminen könnte auch für den Menschen ein Gesundheitsrisiko sein. Nitrit ist ein normaler Bestandteil des menschlichen Speichels (87) und in Konzentrationen darin enthalten, die die Bildung von Nitrosaminen aus Aminophenazon und PIP ermöglichen (101).

In den Verdauungstrakt gelangt Nitrit auch häufig als Bestandteil der Nahrung, ebenso Nitrat, das durch bakterielle Reduktion sehr leicht in Nitrit übergehen kann. In Abhängigkeit von Nitratgehalt der Nahrung schwankt die Nitritkonzentration im Speichel und erreicht gelegentlich extrem hohe Werte (87).

Eine andere endogene Quelle für Nitrit ist der Magensaft. Es wurde festgestellt, daß dessen Nitritkonzentration bei höheren pH-Werten zunimmt (102). Im hypo- oder achlorhydrischen Magen findet man eine vermehrte Durchsetzung mit Nitrat-reduzierenden Darmkeimen und eine erhöhte Menge an Nitrit und N-Nitrosoverbindungen (88). Da der pH-Wert des Magensaftes nach Einnahme von CIM mitunter bis zur Achlorhydrie ansteigt (103), ist beim CIM die Wahrscheinlichkeit einer endogenen N-Nitrosierung besonders groß (88,104). Am Beispiel des PIP wurde nachgewiesen, daß Arzneistoffe bereits durch endogen vorhandenes Nitrit im menschlichen Magen nitrosiert werden können (105).

2.1.5. Der NAP-Test

Ein Cancerogenitätsversuch bei Tieren durch Verfüttern eines Arzneistoffs zusammen mit Nitrit ist eine aufwendige und relativ unempfindliche Methode, um das Risiko einer endogenen N-Nitrosierung für den Menschen zu beurteilen. In der Regel werden möglichst hohe Dosen verwendet, weil noch innerhalb der normalen Lebenszeit der Versuchstiere statistisch auswertbare Ergebnisse erhalten werden sollen. Meist fällt eine Beurteilung hinsichtlich der Nitrosierungsrate bei normalen Dosierungen außerordentlich schwer.

Ebenso ungeeignet für eine Risikoabschätzung ist die quantitative Bestimmung der nach Verabreichung realistischer Konzentrationen in vivo gebildeten N-Nitrosoverbindung. Die dabei zu berücksichtigenden kinetischen Parameter der Resorption und Metabolisierung der beteiligten Stoffe, insbesondere der N-Nitrosoverbindungen, sind nahezu unbekannt.

Vernünftiger ist es, das Risikopotential nitrosierbarer Arzneistoffe in zwei Schritten zu ermitteln:

1. Bestimmung der Nitrosierbarkeit eines Arzneistoffs unter Standardbedingungen in einem definierten chemischen System;
2. Prüfung auf Carcinogenität im Tierversuch, wenn die Reaktivität hoch ist.

Basierend auf diesen Überlegungen wurde 1978 von einer Expertengruppe der WHO ein chemischer In-vitro-Test zur Bestimmung der Nitrosierbarkeit von Arzneistoffen vorgeschlagen (106). Zur Durchführung dieses NAP-Testes (Nitrosation Assay Procedure) wurden folgende Bedingungen festgelegt:

Konzentration des Arzneistoffs:	10 mmol/l
Konzentration an Nitrit:	40 mmol/l
Reaktionstemperatur:	37°C
pH:	3 - 4
Reaktionszeit:	1 h und 4 h

Die Konzentrationen der Reaktionspartner ermöglichen bei einem angemessenen Überschuß an Nitrit auch die Untersuchung von Verbindungen niedriger Reaktivität. Bei 37°C ist die Zersetzung von Salpetriger Säure vernachlässigbar gering, und der gewählte pH-Bereich entspricht in etwa dem pH des Magensaftes nach Nahrungsaufnahme. Zwei verschiedene Reaktionszeiten sollen ermöglichen, sowohl schnelle als auch langsame Nitrosierungen zu erfassen und komplexe Reaktionen zu Ende ablaufen zu lassen.

Der NAP-Test dient vorzugsweise als Referenzverfahren zur Erstellung einer Reaktivitätsskala (WHO-Skala), in der die Arzneistoffe nach ihrer relativen Nitrosierbarkeit eingeordnet sind. Die überwiegende Mehrzahl der Arzneistoffe, vor allem solche mit tertiären Aminstrukturen, ist am unteren Ende dieser Skala angesiedelt und kann deshalb im Hinblick auf das Risiko einer In-vivo-Nitrosierung als wenig relevant bzw. als unbedenklich eingestuft werden. Den oberen Skalenbereich besetzen gewöhnlich sekundäre Amine und die meisten Alkylamide; die Spitzenpositionen nehmen jedoch wieder zwei tertiäre Amine ein: Aminophenazon und Metamizol.

Arzneistoffe, die nach Durchführung des NAP-Testes im oberen Drittel der WHO-Skala einzuordnen sind, müssen hinsichtlich der biologischen Aktivität ihrer N-Nitrosoprodukte

genauer geprüft werden (107). Auf diesem Wege wurde festgestellt, daß Substanzen sehr ähnlicher Struktur und Reaktivität ein völlig unterschiedliches Risikopotential haben können. Ein Beispiel ist das Substanzpaar Aminophenazon und Metamizol. Während Aminophenazon das cancerogene NDMA bildet, hydrolysiert Metamizol zu Formaldehyd, Sulfit und 4-Monomethylaminoantipyrin. Letzteres reagiert mit Nitrit zu 4-Nitroso-N-methylaminoantipyrin, einem Nitrosamin, das weder mutagene noch carcinogene Eigenschaften hat (108).

2.2. Die verwendeten Cyclodextrine und Arzneistoffe

2.2.1. Die Cyclodextrine

In den Versuchen wurden α-, ß- und γ-CD verwendet. Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-CD (DIMEB) wurde nach einer Vorschrift von SZEJTLI et al. (109) aus ß-CD synthetisiert.

2.2.2. Die Arzneistoffe

2.2.2.1. Die Auswahlkriterien

Bei einer Problemstellung, die die Nitrosierbarkeit eines Arzneistoffs mit dessen Komplexierbarkeit durch CD verknüpft, kommt der Auswahl geeigneter Verbindungen eine besondere Bedeutung zu. Berücksichtigung muß dabei auch die Frage nach einer möglichen Gesundheitsgefährdung finden.

Aus Sicherheitsgründen wurden nur Testsubstanzen verwendet, deren N-Nitrosoprodukte einen niedrigen Dampfdruck aufweisen. Arzneistoffe mit tertiärer Aminstruktur bilden überwiegend flüchtige Nitrosamine (86) und kamen daher nicht in Betracht.

Zur Vermeidung unnötiger Risiken gilt beim Umgang mit cancerogenen Stoffen die Maxime: erzeugen - messen - vernichten. Eine unkomplizierte Probenaufbereitung ist aber nur möglich, wenn der Arzneistoff und die entsprechende N-Nitrosoverbindung günstige analytische Voraussetzungen mitbringen.

Für die geplanten Versuche mußten Arzneistoffe gefunden werden, die folgende Eigenschaften haben:

- Eine Molekülstruktur, die Wechselwirkungen mit CD ermöglicht. Es sollten bevorzugt Arzneistoffe herangezogen werden, von denen die Bildung einer Einschlußverbindung des CD bereits beschrieben ist.
- Eine nitrosierbare Stickstoffgruppierung muß vorhanden sein. Günstig wären Arzneistoffe, die bekanntermaßen besonders leicht N-Nitrosoverbindungen bilden.
- Das Reaktionsprodukt darf nicht zur Gruppe der flüchtigen Nitrosamine gehören.
- Die analytische Bestimmung der N-Nitrosoverbindung soll möglichst einfach und ohne Störung durch den nicht umgesetzten Anteil möglich sein.

2.2.2.2. Piperazin

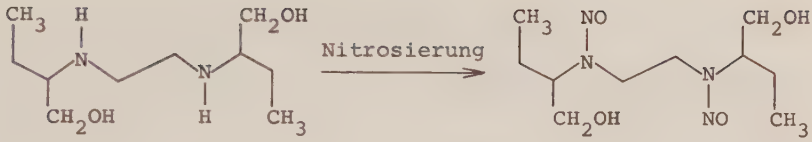
Das Anthelminthikum PIP verfügt über zwei sekundäre Aminstrukturen und bildet infolge seiner geringen Basizität (pK_a 5,6) außerordentlich leicht N-Nitrosoverbindungen. Je nach den Versuchsbedingungen entsteht Mononitrosopiperazin (pK_a 6,8) oder Dinitrosopiperazin (86,110)(Abb. 2).

Piperazin	Mononitrosopiperazin	Dinitrosopiperazin
MG 86,14	MG 115,14	MG 144,14

Abb. 2: N-Nitrosierung von Piperazin

2.2.2.3. Ethambutol

In Bezug auf das Nitrosierungsverhalten sind das Tuberkulostatikum ETB und PIP einander sehr ähnlich. Das symmetrisch gebaute Ethylendiaminderivat (pK_a 6,0) reagiert mit Nitrit in hoher Ausbeute zu Dinitrosoethambutol (111)(Abb. 3). Die Existenz des Mononitrosoderivats wird bisher nur vermutet (86,110).



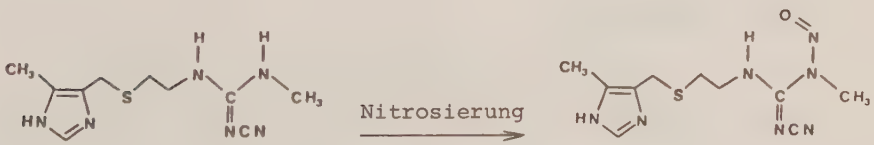
Ethambutol
MG 204,31

Dinitrosoethambutol
MG 262,31

Abb. 3: N-Nitrosierung von Ethambutol

2.2.2.4. Cimetidin

Der spezifische H_2-Rezeptorenblocker CIM verfügt über eine Guanidinstruktur, die in vitro leicht nitrosierbar ist. Besonders in stark saurer Lösung entstehen hohe Ausbeuten an NCIM (88,107)(Abb. 4).



Cimetidin
MG 252,34

N-Nitrosocimetidin
MG 281,34

Abb. 4: N-Nitrosierung von Cimetidin

2.2.2.5. Ephedrin

Im Vergleich zu den bisher genannten Substanzen reagiert das Sympathikomimetikum EPH um einige pK-Stufen stärker basisch (pK_a 9,4). Entsprechend langsam verläuft die Bildung von N-Nitrosoephedrin (NEPH)(112)(Abb. 5).

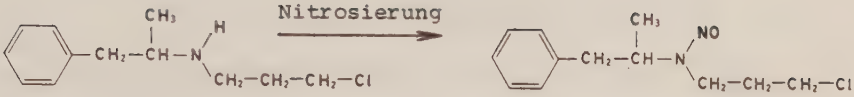
Ephedrin
MG 165,23

N-Nitrosoephedrin
MG 194,23

Abb. 5: N-Nitrosierung von Ephedrin

2.2.2.6. Mefenorex

Das Anorektikum Mefenorex (MEF) war bisher nicht auf seine Nitrosierbarkeit untersucht. In dieser Arbeit wird gezeigt, daß sich das sekundäre Amin MEF mit Nitrit zu N-Nitroso-mefenorex (NMEF) umsetzen kann (Abb. 6).



Mefenorex

MG 211,73

N-Nitrosomefenorex

MG 240,73

Abb. 6: N-Nitrosierung von Mefenorex

2.2.2.7. Fencamfamin

Auch vom psychotropen Energetikum Fencamfamin (FEN) war bisher kein N-Nitrosoderivat bekannt. Die Substanz erwies sich in Untersuchungen dieser Arbeit als nitrosierbar (Abb. 7). Jedoch ist die Ausbeute an N-Nitrosofencamfamin (NFEN) normalerweise sehr gering.

Fencamfamin

MG 215,33

N-Nitrosofencamfamin

MG 244,33

Abb. 7: N-Nitrosierung von Fencamfamin

2.3. NMR-Methoden

2.3.1. Der Komplexbildungsnachweis mittels ^{1}H-NMR

Mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie können Informationen über eine Einschlußbildung in Lösung bis herab zur Ebene einzelner Atome erhalten werden. DEMARCO und THAKKAR (113) beschrieben eine ^{1}H-NMR-Methode zur Charakterisierung der Wechselwirkungen des ß-CD mit einer Auswahl von aromatischen Substraten. Die Autoren stellten fest, daß der Einschluß einer aromatischen Gruppe eine Resonanzverschiebung der CD-Protonen H-3 und H-5 zu höheren Feldstärken - niedrigeren δ-Werten (ppm) - bewirkt. H-1, H-2 und H-4 bleiben hingegen nahezu unbeeinflußt. Dieses differenzierte Verhalten der CD-Protonen ergibt sich aus der Molekülstruktur der CD.

CD bestehen aus α-1,4-ringverknüpften Glucoseeinheiten, die ausnahmslos in der C1-Sessel-Konformation vorliegen (Abb. 8). Infolge dieses regelmäßigen Aufbaus befinden sich die primären Hydroxylgruppen auf der engen Seite des konischen Moleküls (b-Seite), während die sekundären Hydroxylgruppen auf der gegenüberliegenden Seite (a-Seite) angeordnet sind (Abb. 9). H-3 und H-5 sind in den Hohlraum gerichtet, und H-1, H-2 und H-4 liegen auf der Außenseite. H-6_a und H-6_b (zusammengefaßt als H-6) umsäumen die b-Seite und können auf Grund der freien Drehbarkeit der C-6-Gruppe auch in den Hohlraum gerichtet sein.

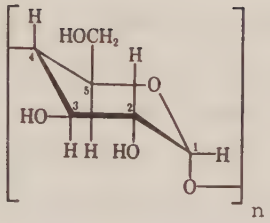


Abb. 8: Die Glucoseeinheit der Cyclodextrine

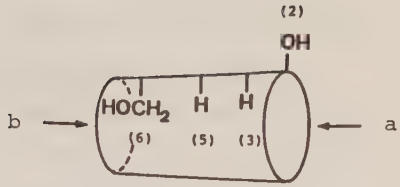


Abb. 9: Das funktionelle Strukturschema der Cyclodextrine

Bei der Bildung eines Einschlußkomplexes mit der aromatischen Gruppe eines Gastmoleküls erfahren die Protonen im Innern oder in der Nähe des Hohlraums (H-3, H-5 oder H-6) eine magnetische Abschirmung. Hervorgerufen wird dieser Effekt durch die magnetische Anisotropie aromatischer Ringe. Das Magnetfeld H_o des NMR-Spektrometers induziert in der Ebene des Aromaten einen Ringstrom der π-Elektronen. Dieser besitzt wie jeder andere elektrische Strom ein Magnetfeld (Sekundärfeld H_i), das dem äußeren Feld H_o entgegengerichtet ist (Lenz'sche Regel). Protonen, die sich im Abschirmungsbereich der aromatischen Gruppe befinden, können erst dann zur Kernresonanz gebracht werden, wenn die Abschwächung ($-H_i$) durch eine entsprechende Vergrößerung des äußeren Magnetfeldes H_o kompensiert

wird. Das Resonanzsignal dieser Protonen erscheint verschoben bei niedrigeren ppm-Werten. Andererseits werden, wenn es sich um eine Anlagerung an die Außenseite des CD handelt, die Protonen H-1, H-2 und H-4 stärker beeinflußt.

Am Beispiel der p-Hydroxybenzoesäure lassen sich die Effekte eines eingeschlossenen aromatischen Substrates auf die CD-Protonen gut demonstrieren. Die Zugabe steigender Mengen dieser Verbindung bewirkt deutliche Verschiebungen ($\Delta\delta$) der Signale der Protonen H-3 und H-5 zu niedrigeren ppm-Werten. Tabelle 1 zeigt die von DEMARCO und THAKKAR (113) beobachteten Reaktionen der Protonen des ß-CD auf die Anwesenheit einer äquimolaren Menge. Ein negatives Vorzeichen bedeutet, daß das betreffende Proton einem magnetischen Abschirmungseffekt unterliegt. Obwohl die damaligen NMR-Spektrometer von heutigen Geräten hinsichtlich ihrer Genauigkeit und Auflösung weit übertroffen werden, lassen die Werte eindeutig erkennen, daß p-Hydroxybenzoesäure und ß-CD in Lösung einen echten Einschlußkomplex bilden.

Damit war eine Möglichkeit aufgezeigt, echte CD-Einschlußkomplexe aromatischer Arzneistoffmoleküle in Lösung nachzuweisen; Beispiele sind Chlorpromazin (16), Flufenaminsäure (114), Tolbutamid, Chlorpropamid (115), Bencyclan (116) und Acetylsalicylsäure (117).

Die Struktur eines Zimtsäure-ß-CD-Komplexes konnte von UEKAMA et al. (118) aufgeklärt werden. Es handelt sich auch hier um den Einschluß einer aromatischen Gruppe.

BERGERON et al. (11) nutzten die ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur

Tabelle 1: p-Hydroxybenzoesäure-induzierte Verschiebungen (Δδ) des ß-Cyclodextrin in D_2O, aufgenommen bei 100 MHz gegen Tetramethylsilan als externen Standard, Genauigkeit ±0,02 ppm (113)

CD-Proton	Δδ (ppm)
H-1	-0,04
H-2	-0,04
H-3	-0,14
H-4	-0,04
H-5	-0,21
H-6	-0,06

Untersuchung der Einschlußkomplexe zwischen α-CD und substituierten p-Nitrophenolen. Dabei zeigte sich ein Abschirmungseffekt nur an H-3, während H-5 ins tiefere Feld - zu höheren ppm-Werten - verschoben war. Offenbar dringt das Gastmolekül mit der polaren Nitrogruppe voran in den Hohlraum des α-CD ein. Dieser Vorgang ist mit hydrophoben Wechselwirkungen, denen eine wichtige Funktion bei der Bildung von CD-Einschlußverbindungen zugeschrieben wird, nicht zu erklären. Die Autoren kamen statt dessen zu dem Schluß, daß auch "Dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkungen" eine wesentliche Komponente der Bindungsenergie zwischen CD und Substrat darstellen.

Anisotropie-Effekte treten in der Kernresonanzspektroskopie auch an Mehrfachbindungen und Carbonylgruppen auf (119). Gelangt ein solches Strukturelement als Bestandteil eines Gastmoleküls in den Hohlraum des CD, dann ist das wieder an einer

Resonanzverschiebung der CD-Protonen H-3 und H-5 ins höhere Feld erkennbar. Auf diese Weise gelingt der Nachweis echter CD-Einschlußkomplexe des Hydrocortisons (46,120).

Bei der ^{1}H-NMR-Untersuchung der ß-CD-Einschlußkomplexe einiger Barbiturate fanden THAKKAR und DEMARCO (121) eine unzweideutige Korrelation zwischen den Bildungskonstanten K_c, bestimmt durch die Löslichkeitsmethode (122), und den Substrat-induzierten Änderungen der chemischen Verschiebung ($\Delta\delta$) des H-5 in der Reihenfolge: Barbital < Amobarbital < Pentobarbital < Phenobarbital. Nach Meinung der Autoren wird der starke Effekt des Phenobarbitals durch den vollständigen und alleinigen Einschluß des Phenylringes hervorgerufen. ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Untersuchungen durch OTAGIRI et al. (123) ergaben jedoch, daß die 5-Ethylgruppe und der Heterocyclus eingeschlossen werden.

Die Position der anisotropen Gruppe eines Gastmoleküls kann aus einem Vergleich der relativen Beträge von $\Delta\delta$ für H-3 und H-5 abgeschätzt werden. In den genannten Barbituratkomplexen mit ß-CD ist eine Verschiebung von H-3 nicht feststellbar. Es erscheint daher wahrscheinlich, daß die Gastmoleküle nur in die enge Öffnung des ß-CD (b-Seite) eindringen.

NAKAJIMA et al. (116) nennen detaillierte NMR-Daten der Einschlußkomplexe zwischen Bencyclan und α-, ß- und γ-CD. Aus ihnen wird die Orientierung des Gastmoleküls im betreffenden CD-Komplex deutlich. Im α-CD-Komplex befindet sich das Bencyclan mit der aromatischen Gruppe in der weiten Öffnung

des Hohlraums (a-Seite), während es beim ß- und γ-CD in der b-seitigen Öffnung steckt.

Eine magnetische Abschirmung der CD-Protonen H-3 und H-5 kann auch beim Einschluß einer gesättigten hydrophoben Struktur eintreten. THAKKAR und DEMARCO (121) führen die signifikanten Verschiebungen des H-5, die bei der Komplexbildung zwischen den aliphatisch substituierten Barbituraten und ß-CD auftreten, auf hydrophobe Wechselwirkungen zurück. Damit sind auch die von UEKAMA et al. (50) festgestellten Verschiebungen der CD-Protonen H-3, H-5 und H-6 in den Komplexen zwischen Digoxin und α-, ß- und γ-CD zu erklären.

FRANK und CHO (124) berichten von einer gleichmäßigen Verschiebung aller CD-Protonen zu höheren Feldstärken bei der Komplexbildung zwischen Prostaglandin E_2 und ß-CD. Die Autoren erkannten daran, daß nur eine Kette des Gastmoleküls den Hohlraum des CD durchdringt, während sich die Parallelkette entlang der Außenseite des ringförmigen Wirtsmoleküls erstreckt.

An den genannten Beispielen wird deutlich, daß die ^{1}H-NMR-Spektroskopie ein inzwischen übliches Verfahren zur Untersuchung der verschiedensten CD-Komplexe in Lösung ist. In den eigenen Untersuchungen waren die Substrat-induzierten Effekte auf die CD-Protonen im allgemeinen gut reproduzierbar. Grundsätzlich kann die Bildung eines CD-Einschlußkomplexes auch an einer Resonanzverschiebung der Protonen des

Gastmoleküls erkannt werden (116). Diese Variante lieferte in eigenen Versuchen jedoch keine reproduzierbaren NMR-Daten. Aus diesem Grund wurden die CD-induzierten Effekte auf die Protonen eines Gastmoleküls hier nicht näher dargestellt.

2.3.2. Die Bestimmung der molaren Zusammensetzung eines Cyclodextrin-Addukts aus der ^{1}H-NMR-Integrationskurve

Die Fläche unterhalb eines ^{1}H-NMR-Signals ist der Zahl der in Resonanz befindlichen Protonen proportional. Daher verhalten sich die Flächen verschiedener Signale wie die Anzahl der entsprechenden Protonen. Dieses Verhältnis kann durch Integration der Flächeninhalte, d.h. aus der Integrationskurve, ermittelt werden.

Bei der Aufnahme des ^{1}H-NMR-Spektrums eines gelösten CD-Addukts werden sowohl die Protonen des Gastmoleküls als auch die CD-Protonen erfaßt. Zur Bestimmung der molaren Zusammensetzung müssen einzeln stehende, gut ausgebildete Signale bereits bekannter Strukturelemente beider Komponenten vorhanden sein; in Bereichen gegenseitiger Signalüberlagerungen ist eine Auswertung nicht möglich.

Die CD-Protonen, ausgenommen H-1, liefern ein charakteristisches Multiplett zwischen 3,4 und 3,9 ppm. Division der Stufenhöhe der Integrationskurve über diesem Bereich durch die Anzahl der entsprechenden CD-Protonen (ß-CD: 49 und γ-CD: 56) ergibt den für ein CD-Proton geltenden Integralwert Ip_{CD}.

Der Wert von Ip_{Gast} ist der Quotient aus der Stufenhöhe der Integrationskurve über einem Kernresonanzsignal des Gastmoleküls und der zugehörigen Protonenanzahl.

Ip_{Gast} und Ip_{CD} stehen im molaren Verhältnis von Gastmolekül und CD. Auf diese Weise kann die molare Zusammensetzung eines CD-Addukts bestimmt werden, ohne daß zuvor eine Auftrennung in Gast- und Wirtskomponente erforderlich ist. In Abhängigkeit von der Meßgenauigkeit des Spektrometers liegt die Fehlergrenze bei etwa ±5 bis 10% (119).

2.4. Die Verfahrensweise bei der Nitrosierung

2.4.1. Die Reaktionsbedingungen

Ein möglicher Einfluß von CD auf die Nitrosierbarkeit von Arzneistoffen kann nur dann festgestellt werden, wenn die Versuche unter konstanten Bedingungen dürchgeführt werden. Der NAP-Test ermöglicht den direkten Vergleich des Nitrosierungsverhaltens verschiedener Arzneistoffe und sollte sich daher auch für die Untersuchung eines entsprechenden Hilfsstoffeffekts eignen. Einzelne Standardbedingungen wurden jedoch anders als im NAP-Test gewählt. So wurde die Bestimmung der gebildeten Produkte nicht nur nach den festgelegten Zeiten von 1 h und 4 h vorgenommen. Durch weitere Probenahmen, die in ihrer Anzahl und zeitlichen Verteilung der Reaktivität des Arzneistoffs angepaßt waren, konnte der Verlauf einer Nitrosierung sehr viel genauer verfolgt werden.

Dadurch wurde es möglich, reaktionskinetische Betrachtungen anzustellen.

PIP und ETB werden sehr schnell nitrosiert. Entsprechend kurz mußten daher die Bestimmungsintervalle festgelegt werden, anderenfalls wären katalytische oder inhibitorische Effekte eines zugesetzten Stoffes kaum noch erkennbar gewesen.

CIM reagiert wie ein typisches Amid und zeigt starke Abhängigkeit der Nitrosierungsgeschwindigkeit vom pH. Unter den Bedingungen des NAP-Testes ist die Umsetzungsrate bei pH 3 - 4 sehr niedrig. Maximale Ausbeuten an NCIM werden erst bei pH 1 erhalten (88,107). Die Konzentrationen der Reaktionspartner wurden aus analytischen Gründen vom NAP-Test abweichend gewählt (siehe 2.7.1.).

EPH, MEF und FEN werden relativ langsam nitrosiert. In diesen Fällen wurden die Arzneistoffkonzentrationen im Vergleich zum NAP-Test verdoppelt, um erhöhte Umsetzungsraten zu erzielen.

2.4.2. Die Nitrosierung in Anwesenheit von Cyclodextrin

Die Nitrosierungsbedingungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Bei den Versuchen mit PIP und ETB betrug das molare Verhältnis zwischen Arzneistoff und CD stets 1:2. Der Überschuß an CD sollte einen erhöhten Anteil von Arneistoffmolekülen in den CD-Komplex drängen. Durch diese Maßnahme wurde die ausgeprägte Hydrophilie der beiden Diamine berücksichtigt.

In den übrigen Fällen wurde der Einfluß der CD auf die Nitrosierbarkeit der Arzneistoffe beim Molverhältnis 1:1 untersucht.

Die CD wurden jeweils vor der Nitritzugabe in der entsprechenden Arzneistoff-Lösung bei 37°C gelöst. Bei dieser Temperatur wird auch mit ß-CD die erforderliche Konzentration von 20 mmol/l im Reaktionsansatz erreicht. Nach SZEJTLI (125) steigt die Wasserlöslichkeit des ß-CD im Intervall zwischen 30°C und 40°C von 19,8 mmol/l auf 30,9 mmol/l.

Tabelle 2: Vom NAP-Test abgeleitete Nitrosierungsbedingungen, Reaktionstemperatur 37°C

	Arzneistoff (mmol/l)	Molverhältnis Arzneistoff:CD	Nitrit (mmol/l)	pH
NAP-Test	10	-	40	3-4
Piperazin	10	1 : 2	40	3,0
Ethambutol	10	1 : 2	40	3,1
Cimetidin	5	1 : 1	20	1,1
Ephedrin	20	1 : 1	40	3,2
Mefenorex	20	1 : 1	40	3,5
Fencamfamin	20	1 : 1	40	3,6

2.4.3. Der Reaktionsansatz

Bevor die geplanten Nitrosierungsversuche in vollem Umfang aufgenommen werden konnten, mußte ein Verfahren entwickelt werden, das eine sichere Handhabung der gebildeten N-Nitrosoprodukte zuließ. Das Risiko eines unbeabsichtigten Kontakts mit den carcinogenen Reaktionsprodukten ist minimal, wenn die pro Versuch eingesetzten Stoffmengen auf das unbedingt erforderliche analytische Maß begrenzt werden. Da die Nitrosierungsbedingungen bereits vorgegeben waren, blieb nur die Möglichkeit, das Ansatzvolumen gering zu halten. Nach anfänglichen Vorversuchen mit größeren Ansätzen konnte das Ansatzvolumen schließlich bis auf 2,2 ml - CIM: 2,4 ml - reduziert werden, ohne dadurch die Genauigkeit der quantitativen Bestimmung zu beeinträchtigen. Damit befand sich in keinem Fall mehr als die theoretische Maximalmenge von 44 µmol Nitrosamin im Reaktionsgefäß.

Die Untersuchungen mit PIP, ETB, EPH, MEF und FEN wurden nach einem einheitlichen Schema durchgeführt. Es wurde dabei stets von einer Arzneistoff-Stammlösung (11 bzw. 22 mmol/l), die mit Salzsäure auf pH 2 eingestellt worden war, ausgegangen. Eine Lösung von 3,036 g Natriumnitrit in 100 ml Wasser ergab die Nitrit-Stammlösung (440 mmol/l). Der Reaktionsansatz entsteht beim Vermischen der Arzneistoff-Stammlösung (37°C) mit der Nitrit-Stammlösung (37°C) im Volumenverhältnis 10:1. Zur Beendigung der Nitrosierungsreaktion wurden die zu bestimmten Zeiten zu entnehmenden Proben in verdünnter Kalilauge neutralisiert.

2.4.4. Die Methode der quantitativen Bestimmung

In Wasser gelöste Nitrosamine zeigen UV-Absorptionsmaxima bei 230 bis 240 nm (ε etwa 10 000) und 330 bis 350 nm (ε etwa 100)(86). Demnach lassen sich Nitrosamine durch Absorptionsmessung innerhalb des kürzerwelligen Bereichs leicht erfassen. Diese direkte Bestimmung kann unmittelbar mit dem Reaktionsansatz durchgeführt werden, wenn alle anderen darin enthaltenen Bestandteile keine oder eine nur geringe Absorption bei der betreffenden Wellenlänge zeigen. Eine solche Bestimmungsmethode wurde von KINAWI und KIA (126) in ihren Untersuchungen zur Umsetzung von Cyclohexylsulfaminsäure mit Salpetriger Säure beschrieben. Dabei wird die Reaktion in einer Halbmikroküvette durchgeführt und durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 250 nm verfolgt.

Das Absorptionsmaximum der N-Nitrosoverbindungen der eingesetzten Arzneistoffe, ausgenommen NCIM, liegt einheitlich bei 240 nm. Die reinen Arzneistoffe und die CD sind in den verwendeten Konzentrationen bei dieser Wellenlänge nicht nachweisbar. Nitrit absorbiert bei 240 nm nur schwach. Da Nitrit in allen Versuchen in gleicher Konzentration eingesetzt wurde, war sein geringer Störeffekt gut reproduzierbar und ohne nachteiligen Einfluß auf die anschließenden vergleichenden Betrachtungen.

Die photometrische Bestimmung einer im Reaktionsansatz entstandenen N-Nitrosoverbindung konnte also ohne eine vorherige Abtrennung vom nicht umgesetzten Anteil erfolgen.

Hierzu wurden die einzelnen Proben der Reaktionslösung (200 µl) in einem Meßkolben von 25 ml mit verdünnter Kalilauge versetzt. Sofort anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 240 nm ($E_{240\ nm}$) in einer 1-cm-Küvette gegen Wasser.

2.5. Piperazin

Für die ersten Untersuchungen wurde PIP eingesetzt, das auf Grund der leichten Nitrosierbarkeit als besonders geeigneter Stoff zur Erprobung des NAP-Testes erschien. Im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) ist die Bildung von Dinitrosopiperazin als Identitätsprüfung aufgenommen worden. Ausschlaggebend für die Wahl dieser Substanz war jedoch auch ihre Molekülgröße, die Wechselwirkungen mit CD vermuten ließ.

Vor Beginn der Nitrosierungsversuche war zu prüfen, ob PIP eine Tendenz zur Assoziation mit CD zeigt. Ließe sich gar die Existenz einer PIP-CD-Einschlußverbindung in Lösung nachweisen, wäre es möglich, daß sie auch im Nitrosierungsansatz vorliegt.

Viele CD-Komplexe kristallisieren oberhalb ihrer Sättigungskonzentration zu festen Einschlußverbindungen. Umgekehrt liegen beim Auflösen der festen Einschlußverbindungen die entsprechenden gelösten Komplexe vor. Daher sollten in den folgenden Nitrosierungsversuchen neben einfachen physikalischen Mischungen auch die festen CD-Addukte der zu nitrosierenden Arzneistoffe eingesetzt werden, sofern sie darstellbar sind.

2.5.1. Piperazin-ß-Cyclodextrin-Addukt

Versuche zur Darstellung einer festen PIP-CD-Einschlußverbindung wurden mit α- und ß-CD durchgeführt, da sie auf Grund ihrer geringen Hohlraumgröße günstige Voraussetzungen für einen Einschluß des relativ kleinen Moleküls bieten. Die ausgeprägte Hydrophilie des PIP ließ in Lösung jedoch nur CD-Komplexe von geringer Stabilität erwarten. Da aber keinerlei Zusammenhang zwischen der Komplexstabilität in Lösung und der Kristallisierbarkeit bzw. der Löslichkeit besteht (127), ist die Bildung einer festen PIP-CD-Einschlußverbindung trotzdem möglich.

PIP und CD wurden bei erhöhter Temperatur (70°C) in einer gemeinsamen wässrigen Phase zusammengegeben. Die Gastkomponente lag dabei zunächst in äquimolaren Mengen vor. Die Bildung eines festen Addukts trat jedoch auch nach mehrtägiger Aufbewahrung im Kühlschrank nicht ein. Daraufhin wurde das Molverhältnis zwischen PIP und CD* auf 5:1 erhöht. Während der Ansatz mit α-CD weiterhin völlig unverändert blieb, setzte nach einigen Tagen die Kristallisation eines bisher nicht bekannten PIP-ß-CD-Addukts ein. Das isolierte Addukt ist an der Luft beständig und nicht hygroskopisch.

---

* α-CD: 6,0 g/100 ml, ß-CD: 1,0 g/100 ml

2.5.1.1. Bestimmung der molaren Zusammensetzung

Das 2. Arzneibuch der DDR gibt eine einfache acidimetrische Gehaltsbestimmung für PIP an. Danach wird die Substanz mit überschüssiger Schwefelsäure versetzt und mit Natronlauge gegen Phenolphthalein zurücktitriert. Bei dem Versuch, nach dieser Methode die quantitative Bestimmung des PIP im Addukt vorzunehmen, zeigte sich jedoch eine störende Wechselwirkung zwischen Phenolphthalein und ß-CD, die das sichere Erkennen des Titrationsendpunktes verhinderte. Als Ausweg bot sich die potentiometrische Ermittlung des Äquivalenzpunktes an. Auf diese Weise wurde die direkte Titration des Addukts mit Salzsäure vorgenommen. Bezogen auf den Säureverbrauch derselben Menge einer äquimolaren Mischung von PIP und ß-CD ergab sich für das Addukt ein Molverhältnis zwischen PIP und ß-CD von 0,89:1.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde das ^{1}H-NMR-Spektrum des Addukts aufgenommen und die molare Zusammensetzung auch nach dem in 2.3.2. dargestellten Verfahren aus der Integrationskurve bestimmt. Mit einem ermittelten Molverhältnis zwischen PIP und ß-CD von 0,86:1 bestätigte sich der potentiometrisch gefundene Wert. Letzterer wurde bei allen folgenden Untersuchungen mit dem PIP-ß-CD-Addukt zu Grunde gelegt.

2.5.1.2. Röntgendiffraktometrische Untersuchung

Zur späteren Diskussion einer möglicherweise veränderten Nitrosierbarkeit des als Addukt eingesetzten PIP sollte das PIP-ß-CD-Addukt zunächst näher charakterisiert werden. Insbesondere interessierte, ob ein echter Einschluß vorliegt. Dieser ist wahrscheinlich, wenn im Röntgenbeugungsspektrum eine neue Kristallgitterstruktur nachweisbar ist. Entspricht das Beugungsmuster des Addukts nicht dem der reinen kristallinen Komponenten bzw. deren Gemisch, ist das ein Beweis für eine neue Kristallgitterstruktur und indirekt für einen Einschlußzustand (127).

Unter Anwendung der Röntgenweitwinkeltechnik - Guinier-Verfahren - wurden die Röntgenbeugungsspektren des Addukts, PIP, ß-CD und einer der Zusammensetzung des Addukts entsprechenden Verreibung aus PIP und ß-CD aufgenommen (Abb. 10 bis 13). Die Spektren des ß-CD und der Verreibung sind einander nahezu gleich. Auf Grund der niedrigen Konzentration (6,3%) ist PIP in der Verreibung nicht nachweisbar. Markante Reflexionen treten bei $\Theta = 5{,}3^{\circ}$ und $6{,}2^{\circ}$ auf. Hingegen ist das Beugungsmuster des Addukts davon verschieden, was beweist, daß keine einfache physikalische Mischung der beiden kristallinen Komponenten vorliegt. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich um eine Einschlußverbindung zwischen PIP und ß-CD.

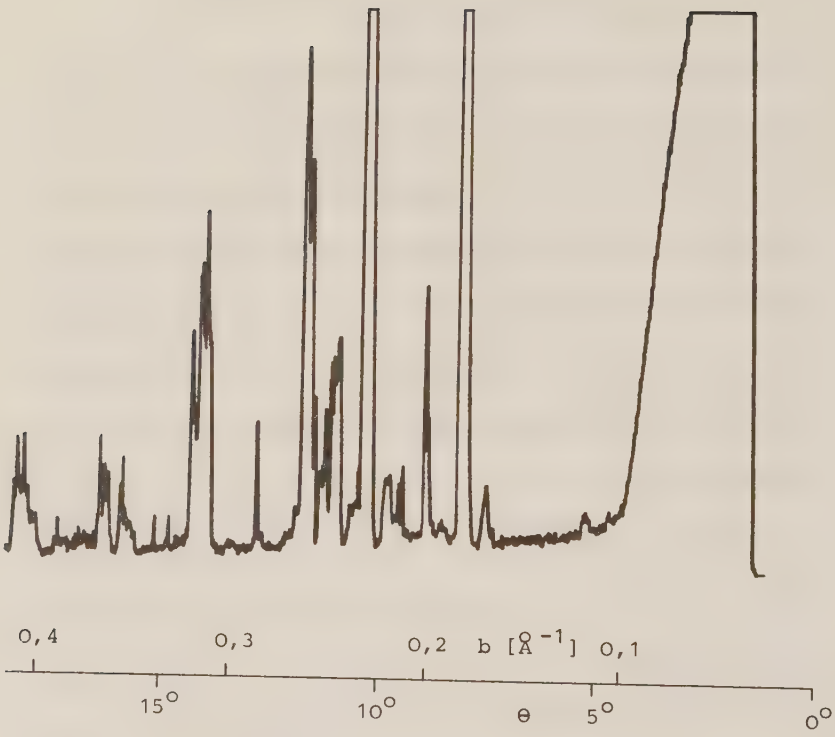


Abb. 10: Röntgendiffraktogramm von Piperazin

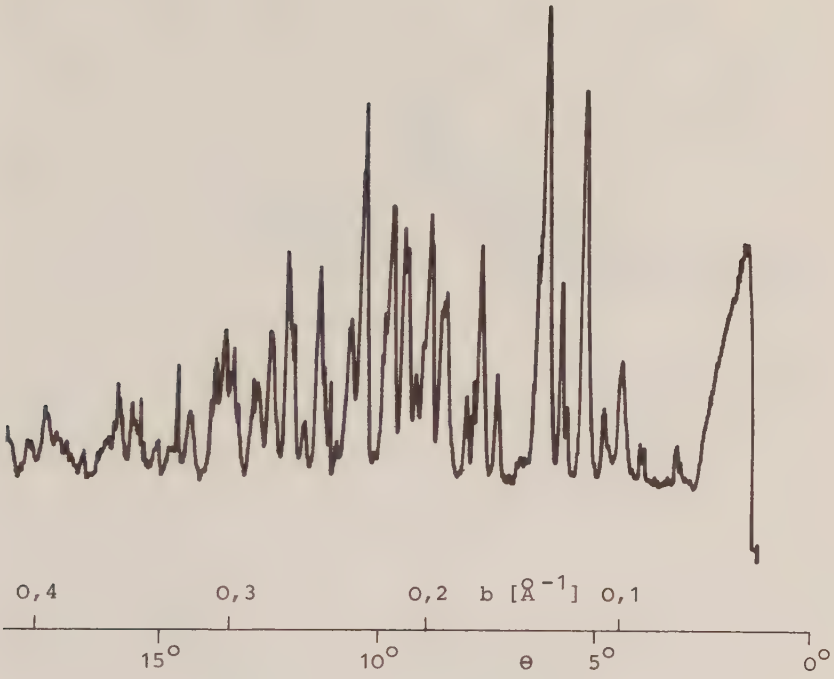


Abb. 11: Röntgendiffraktogramm von ß-Cyclodextrin

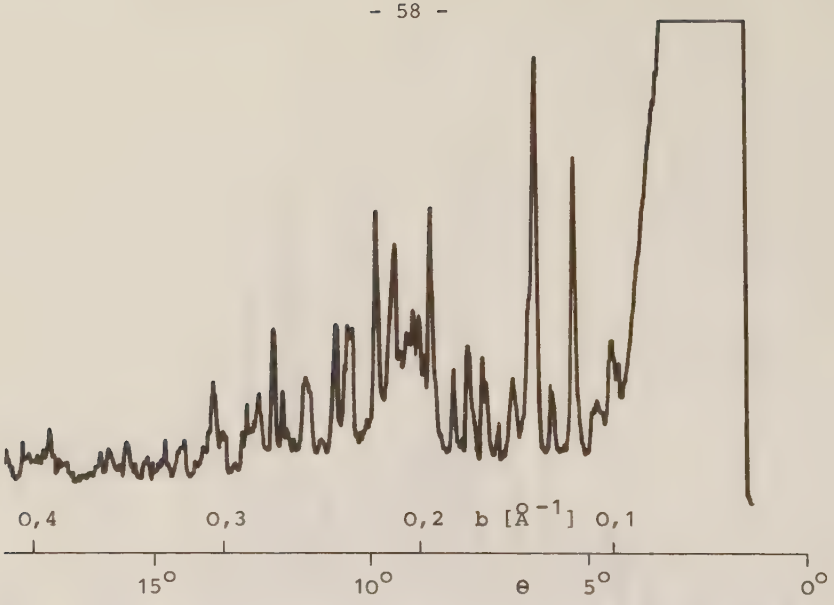


Abb. 12: Röntgendiffraktogramm der Piperazin-ß-Cyclodextrin-Verreibung (6,3%)

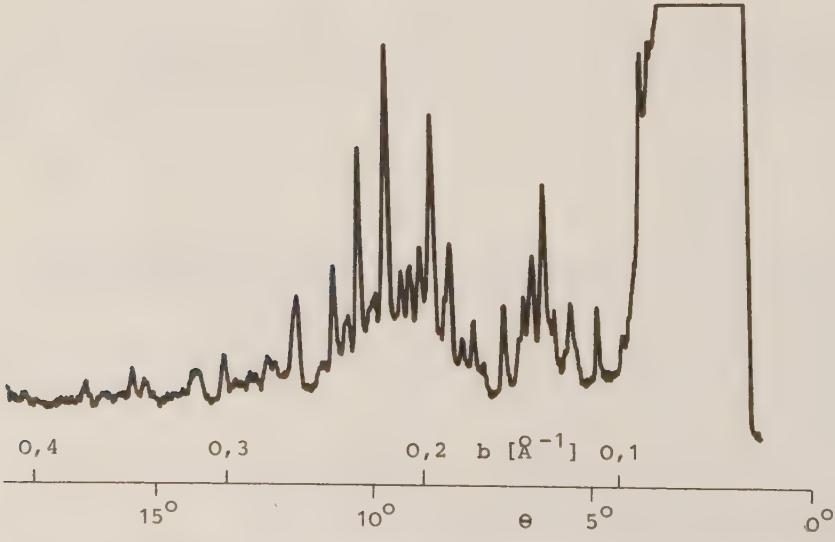


Abb. 13: Röntgendiffraktogramm des Piperazin-ß-Cyclodextrin-Addukts

2.5.2. NMR-Untersuchungen

Zur Feststellung etwaiger gelöster Einschlußkomplexe dienten äquimolare Mischungen des PIP mit α-, ß- und γ-CD. Zusätzlich wurde das zuvor beschriebene PIP-ß-CD-Addukt untersucht. So war ein direkter Vergleich mit der entsprechenden Mischung möglich.

Unmittelbar nach dem Lösen der Proben in Deuteriumoxid (D_2O) erfolgte die Aufnahme der ^{1}H-NMR-Spektren bei 250 MHz gegen 3-Trimethylsilyl-propionsäure-d_4-Natriumsalz (TSP) als internen Standard. Die Tabellen 3 bis 6 zeigen die chemischen Verschiebungen der CD-Protonen in An- und Abwesenheit von PIP sowie die ermittelten Differenzen (Δδ).

$\Delta\delta$ (ppm) = $\delta_{PIP + CD}$ (ppm) - $\delta_{freies\ CD}$ (ppm)

Tabelle 3: Einfluß von Piperazin (PIP) auf das Protonenresonanzspektrum von α-Cyclodextrin (α-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	α-CD ppm	PIP + α-CD ppm	Differenz ppm
H-1	4,9565	4,9567	0,0002
H-2	3,5330	3,5265	-0,0065
H-3	3,9093	3,8909	-0,0184
H-4	3,4673	3,4495	-0,0178
H-5	3,7467	3,7465	-0,0002
H-6	3,8069	3,8024	-0,0045

Tabelle 4: Einfluß von Piperazin (PIP) auf das Protonenresonanzspektrum von ß-Cyclodextrin (ß-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	ß-CD ppm	PIP + ß-CD ppm	Differenz ppm
H-1	4,9606	4,9858	0,0252
H-2	3,5363	3,5567	0,0204
H-3	3,8428	3,8268	-0,0160
H-4	3,4651	3,4900	0,0249
H-5	3,7146	3,6952	-0,0194
H-6	3,8034	3,8223	0,0189

Tabelle 5: Einfluß von Piperazin (PIP) auf das Protonenresonanzspektrum von ß-Cyclodextrin (ß-CD) bei Einsatz des PIP-ß-CD-Addukts, aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	ß-CD ppm	PIP-ß-CD-Addukt ppm	Differenz ppm
H-1	4,9606	4,9604	-0,0002
H-2	3,5363	3,5394	0,0031
H-3	3,8428	3,8260	-0,0168
H-4	3,4651	3,4649	-0,0002
H-5	3,7146	3,7075	-0,0071
H-6	3,8034	3,7864	-0,0170

Tabelle 6: Einfluß von Piperazin (PIP) auf das Protonenresonanzspektrum von γ-Cyclodextrin (γ-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	γ-CD ppm	PIP + γ-CD ppm	Differenz ppm
H-1	5,1204	5,1255	0,0051
H-2	3,6676	3,6696	0,0020
H-3	3,9379	3,9425	0,0046
H-4	3,5935	3,5966	0,0031
H-5	3,8399	3,8465	0,0066
H-6	3,8763	3,8813	0,0050

PIP + α-CD: Eine bemerkenswerte Verschiebung erfahren nur die Protonen H-3 und H-4. Daran wird eine schwache Wechselwirkung zwischen PIP und dem äußeren Randbereich der a-Seite des α-CD deutlich. Die Verschiebung des H-4 schließt einen Einschlußkomplex, also die Lokalisation des PIP im Ringinnern des α-CD aus.

PIP + ß-CD und PIP-ß-CD-Addukt: Die ermittelten Verschiebungen belegen die Komplexbildung zwischen PIP und ß-CD in wässriger Lösung. Sowohl bei der Mischung als auch beim Addukt treten Verschiebungen der inneren CD-Protonen H-3 und H-5 bzw. H-6 zu höheren Feldstärken auf. Während die Abschirmung des H-3 in beiden Fällen nahezu gleich ist, zeigt jeweils nur eines der Protonen H-5 und H-6 diesen Effekt. Vermutlich bestehen nur relativ schwache Bindungskräfte zwischen eingeschlossenem

PIP und der Hohlraumwandung des ß-CD, so daß die Position des Gastmoleküls etwas variabel und von äußeren Einflüssen abhängig sein kann. Hier könnte auch die Ursache für die extrem langsame Kristallisation des PIP-ß-CD-Addukts (siehe 2.5.1.) liegen.

PIP + γ-CD: Die Protonen des γ-CD zeigen keine Reaktion in Anwesenheit von PIP. Vermutlich ist das PIP-Molekül zu klein, um im Hohlraum des γ-CD genügend Halt zu finden.

2.5.3. Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Piperazin

Es galt zu prüfen, ob die Anwesenheit von CD einen Einfluß auf die Umsetzung von PIP mit Nitrit ausübt. Dazu wurden α-, ß- und γ-CD sowie das PIP-ß-CD-Addukt eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen und Angaben zur Durchführung der Untersuchungen sind dem Abschnitt 2.4. zu entnehmen.

Zur Ermittlung der erforderlichen Versuchsdauer und zur Relativierung etwaiger Effekte der CD wurde PIP zunächst ohne CD-Zusatz nitrosiert. Dabei zeigte sich dessen außerordentlich hohe Reaktivität. Bereits nach 8 min ist kein Stoffumsatz mehr nachweisbar.

Keines der drei CD hat einen Einfluß auf den Reaktionsverlauf (Abb. 14). Selbst das als Addukt eingesetzte PIP wird nicht langsamer nitrosiert als die frei gelöste Substanz.

Wie die NMR-Untersuchungen ergeben hatten, existiert in wässriger Lösung ein PIP-ß-CD-Einschlußkomplex. Jedoch ist

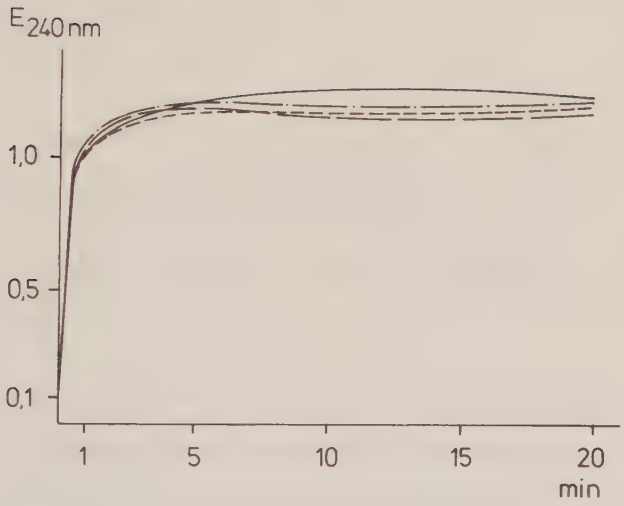


Abb. 14: In vitro-Nitrosierung von Piperazin
in Anwesenheit von Cyclodextrinen bei pH 3

———————— ohne Cyclodextrin

---------- mit α-Cyclodextrin

—— —— —— mit ß-Cyclodextrin

——·——·—— mit γ-Cyclodextrin

nicht festzustellen, daß ß-CD die Aminogruppen des PIP gegen den Angriff des nitrosierenden Agens schützt.

2.5.4. Einfluß von ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Piperazin bei pH 5

Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen scheint die Einschlußbildung mit ß-CD die Nitrosierbarkeit des PIP nicht zu beeinflussen. Der Grund dafür könnte die pH-Abhängigkeit der Komplexbildung sein. Die Adduktbildung und der Komplexbildungsnachweis mittels NMR wurden in schwach basischem Milieu, die Nitrosierung aber bei pH 3 durchgeführt. In saurer Lösung liegt PIP weitestgehend protoniert vor. Das geladene Molekül bildet vermutlich sehr viel schwerer einen ß-CD-Einschlußkomplex als die freie Base.

Schon im schwach sauren Milieu (pH 5) könnte ein größerer Anteil unprotoniertes PIP vom ß-CD eingeschlossen und evtl. der Nitrosierung entzogen werden. Auf alle Fälle müßte sich ein Effekt des ß-CD auf die Nitrosierbarkeit des PIP deutlicher als bei pH 3 abzeichnen können, wenngleich natürlich auch hier die Reaktion mit dem im Gleichgewicht vorliegenden freien PIP ablaufen dürfte.

Zur Durchführung der Versuche war gegenüber der Verfahrensweise bei pH 3 nur eine Änderung erforderlich: Es mußte eine auf pH 4,8 eingestellte PIP-Stammlösung verwendet werden. Dadurch wird nach der Nitrit-Zugabe der pH-Wert 4,96 im Reaktions-

ansatz ohne CD erreicht. In Anwesenheit von ß-CD stellt sich der etwas höhere pH-Wert 5,07 ein.

Ohne CD-Zusatz liegt nach 120 min die maximal erreichbare Nitrosaminkonzentration vor (Abb. 15). Der entsprechende Extinktions-Meßwert ($E_{240\ nm}$ = 0,680) ist etwa halb so groß wie der bei pH 3 erreichte Maximalwert ($E_{240\ nm}$ = 1,230). Es liegt die Vermutung nahe, daß die Umwandlung bei pH 5 lediglich auf der ersten Stufe, also vom PIP zum Mononitrosopiperazin, erfolgt.

Auch in Anwesenheit von ß-CD wird nach 120 min ein ähnlicher Endwert ($E_{240\ nm}$ = 0,640) erreicht. Die geringe Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit sollte eher durch den genannten pH-Unterschied als durch eine Hemmung der Nitrosierung infolge Einschlußbildung verursacht sein. Bei pH 5, also genau zwischen dem Optimum bei pH 3 (86) und vollständiger Hemmung der Nitrosierungsreaktion bei pH 7, ist deren pH-Abhängigkeit besonders stark. Doch selbst wenn die gefundene Verlangsamung der Nitrosierung ausschließlich durch eine Wechselwirkung zwischen PIP und ß-CD zustande käme, wäre sie nur unbedeutend.

Es kann daher festgestellt werden, daß ß-CD auch bei pH 5 praktisch ohne Einfluß auf die Nitrosierbarkeit von PIP ist.

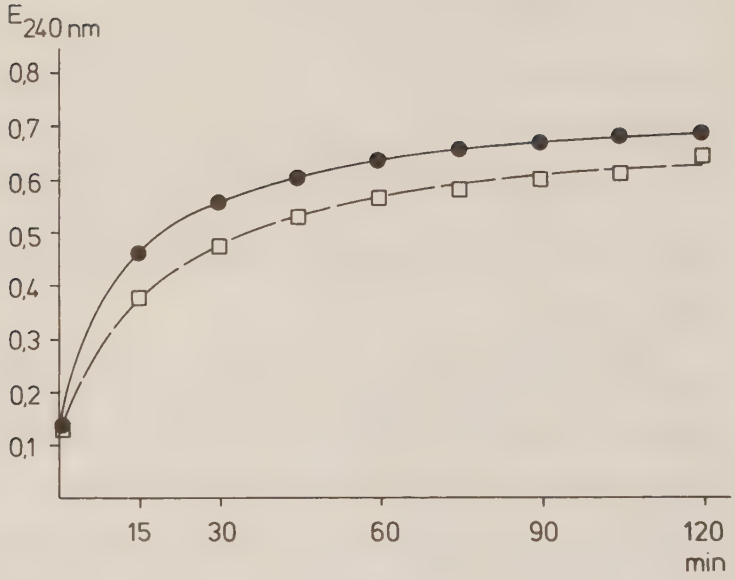


Abb. 15: In vitro-Nitrosierung von Piperazin
in Anwesenheit von ß-Cyclodextrin

●——● ohne Cyclodextrin (pH 4,96)

□— —□ mit ß-Cyclodextrin (pH 5,07)

2.6. Ethambutol

In den weiteren Untersuchungen wurde nochmals ein Arzneistoff eingesetzt, der auf Grund seiner Anwendungsweise und leichten Reaktion mit Nitrit als potente endogene Nitrosamin-Quelle gilt. ETB verfügt wie PIP über zwei sekundäre Aminogruppen, unterscheidet sich als aliphatische Verbindung aber wesentlich in seiner Molekülstruktur. Da die Komplexbildung mit CD entscheidend vom strukturellen Bau der Gastkomponente abhängt, erschien eine diesbezügliche Variation als sinnvoll. Denkbar ist eine Komplexbildung zwischen ETB und CD in der Art einer "Auffädelung" der ringförmigen CD-Moleküle entlang des geradkettigen ETB-Moleküls. Dabei könnten die Aminogruppen vom CD umschlossen werden, was eine verminderte Nitrosierbarkeit zur Folge haben sollte.

Zu den Versuchen zur Darstellung fester ETB-CD-Einschlußverbindungen wurden wässrige Lösungen von ETB und α-, ß- bzw. γ-CD in unterschiedlichen Konzentrations- und Molverhältnissen hergestellt. Eine Kristallisation trat auch nach 14tägiger Aufbewahrung der Lösungen im Kühlschrank in keinem Fall ein.

Eine Bestimmung der Komplexbildung zwischen ETB und CD in Lösung ist mittels ^{1}H-NMR nicht möglich, da die Signale der CD-Protonen von denen der ETB-Protonen verdeckt werden.

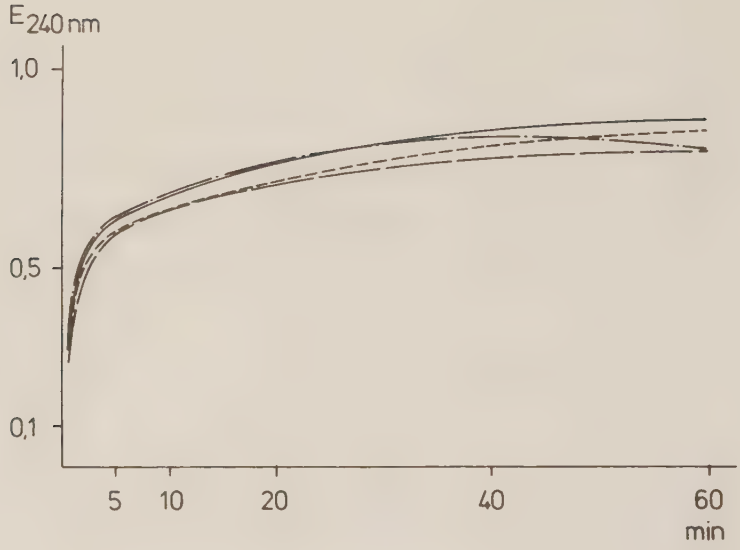


Abb. 16: In vitro-Nitrosierung von Ethambutol in Anwesenheit von Cyclodextrinen

———————— ohne Cyclodextrin

---------- mit α-Cyclodextrin

—— —— —— mit ß-Cyclodextrin

——·——·—— mit γ-Cyclodextrin

2.6.1. Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Ethambutol

In Abwesenheit von CD reagiert ETB unter den im Abschnitt 2.4.2. aufgeführten Reaktionsbedingungen sehr schnell mit Nitrit zum N-Nitrosoderivat. Mit besonders hoher Geschwindigkeit verläuft die Reaktion in den ersten Minuten. Bereits nach 3 min ist die Substanz zu über 50% nitrosiert (Abb. 16). Nach 6 min nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich ab.

Weder α-, ß- noch γ-CD haben einen wesentlichen Einfluß auf diesen Reaktionsverlauf. α- und ß-CD scheinen eine geringfügige Verlangsamung der Nitrosierungsgeschwindigkeit zu bewirken. Selbst wenn sich dieser Effekt statistisch absichern ließe, ist er doch zu gering, um praktische Bedeutung zu erlangen.

2.7. Cimetidin

2.7.1. Nitrosierung von Cimetidin in der Küvette

Die chemischen und analytischen Eigenschaften des CIM sowie des NCIM machten eine besondere Verfahrensweise bei der Nitrosierung von CIM erforderlich.

Wie schon eingangs erwähnt, setzt sich das Guanidinderivat CIM erst in stark saurer Lösung (pH 1) mit Nitrit um, wobei in Säure gelöstes CIM < pH 2 nicht stabil ist (128). Dies fand in der Versuchsdurchführung dadurch Berücksichtigung, daß die Säurezugabe erst zur Reaktionsauslösung erfolgte.

Die starke UV-Absorption des CIM unterhalb 260 nm verhindert die Bestimmung des N-Nitrosoproduktes bei 240 nm. Daher erfolgte die Messung im längerwelligen Bereich bei 305 nm, wo dieser Nachteil nicht auftritt. Nitrit stört nur sehr wenig.

Zur Verminderung der recht hohen Nitrosierungsgeschwindigkeit wurden die Konzentrationen der Reaktionspartner im Vergleich zum NAP-Test nur halb so hoch gewählt (5 mmol/l CIM und 20 mmol/l Nitrit). Es zeigte sich, daß die Reaktion dann direkt in einer 1-cm-Küvette unter kontinuierlicher Messung der Absorption bei 37°C durchgeführt und vollständig beobachtet werden kann. Als Vergleich diente Wasser.

2.7.2. Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Cimetidin

Schon nach 25 min werden bei der Nitrosierung von CIM bei pH 1,1 in Abwesenheit von CD 50% der NCIM-Endkonzentration erreicht, obwohl beide Reaktionspartner in einer relativ geringen Konzentration eingesetzt wurden (Abb. 17). Nach 120 min schließlich liegt die Maximalmenge der N-Nitrosoverbindung vor.

Zusatz der drei CD verändert dieses Reaktionsverhalten des CIM nicht. Der Grund dafür liegt vermutlich nicht zuletzt bei den extremen pH-Verhältnissen. In saurer Lösung ist CIM im Imidazolring protoniert (128). Dadurch wird das relativ kleine Molekül sehr hydrophil und als Gastverbindung für CD ungeeignet.

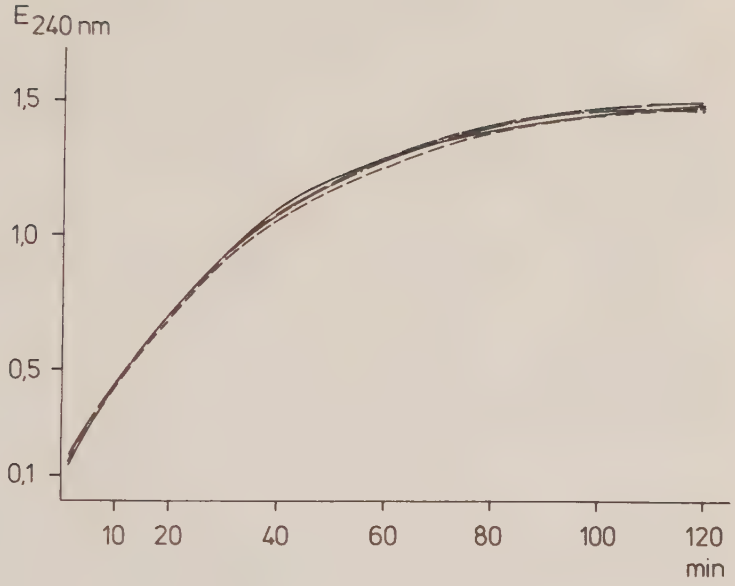


Abb. 17: In vitro-Nitrosierung von Cimetidin
in Anwesenheit von Cyclodextrinen

———————— ohne Cyclodextrin

---------- mit α-Cyclodextrin

—— —— —— mit ß-Cyclodextrin

——·——·—— mit γ-Cyclodextrin

2.8. Ephedrin

Die drei bisher verwendeten Arzneistoffe sind recht hydrophil und zeichnen sich durch ihre sehr leichte N-Nitrosierbarkeit aus. Gegenüber CD verhalten sie sich anscheinend indifferent; eine Komplexbildung konnte nur zwischen PIP und ß-CD registriert werden.

Zur Fortsetzung der Untersuchungen erschien es ratsam, nun vorrangig solche Arzneistoffe einzusetzen, die einen stärker hydrophoben Charakter haben als PIP, ETB und CIM. Unter diesem Gesichtspunkt wurde EPH als nächste Testsubstanz ausgewählt. Dieses verfügt in dem Aromaten über ein hydrophobes Strukturelement, dessen Größe für eine Komplexbildung mit CD günstig ist. In der Literatur sind eine feste EPH-γ-CD-Einschlußverbindung (18) und ein in Lösung existenter EPH-ß-CD-Komplex (129) beschrieben. Von Vorteil ist darüberhinaus, daß EPH bekanntermaßen vergleichsweise langsam nitrosiert wird. So sind eventuelle Effekte der CD leichter nachweisbar.

Es wurde das physiologisch wirksamere L-Isomer verwendet.

2.8.1. NMR-Untersuchungen

Aus L-Ephedrinsulfat und α-, ß- und γ-CD wurden im jeweiligen Molverhältnis 1:1 Mischungen hergestellt. Nach dem Lösen dieser Mischungen in D_2O erfolgte die Aufnahme der ^{1}H-NMR-Spektren. In den Tabellen 7 bis 9 sind die EPH-induzierten chemischen Verschiebungen der CD-Protonen im Vergleich zu den Werten in Abwesenheit von EPH angegeben.

Tabelle 7: Einfluß von Ephedrin (EPH) auf das Protonenresonanzspektrum von α-Cyclodextrin (α-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	α-CD ppm	EPH + α-CD ppm	Differenz ppm
H-1	4,9342	4,9355	0,0013
H-2	3,5116	3,5121	0,0005
H-3	3,8871	3,8527	-0,0344
H-4	3,4454	3,4412	-0,0042
H-5	3,7241	3,7318	0,0077
H-6	3,7853	3,7937	0,0084

Tabelle 8: Einfluß von Ephedrin (EPH) auf das Protonenresonanzspektrum von ß-Cyclodextrin (ß-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	ß-CD ppm	EPH + ß-CD ppm	Differenz ppm
H-1	4,9498	4,9509	0,0011
H-2	3,5211	3,5476	0,0265
H-3	3,8296	3,7709	-0,0587
H-4	3,4531	3,4582	0,0051
H-5	3,6977	3,6065	-0,0912
H-6	3,7606	3,7496	-0,0110

Tabelle 9: Einfluß von Ephedrin (EPH) auf das Protonenresonanzspektrum von γ-Cyclodextrin (γ-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	γ-CD ppm	EPH + γ-CD ppm	Differenz ppm
H-1	5,1285	5,1328	0,0043
H-2	3,6721	3,6804	0,0083
H-3	3,9464	3,9430	-0,0034
H-4	3,6003	3,6045	0,0042
H-5	3,8514	3,8416	-0,0098
H-6	3,8878	3,8846	-0,0032

EPH + α-CD: Nur H-3 zeigt eine deutliche Verschiebung ins höhere Feld. Offenbar tritt das EPH-Molekül lediglich mit der a-Seite des α-CD in Wechselwirkung. Jedoch kann die aromatische Gruppe dabei nicht in den sich verengenden Hohlraum vordringen; es bleibt bei einer lockeren Anlagerung.

EPH + ß-CD: Hier liegt mit Sicherheit ein Einschlußkomplex vor. Die starken Verschiebungen von H-3 und H-5 beweisen eindeutig, daß das EPH-Molekül eine paßgerechte Gastverbindung für den Hohlraum des ß-CD darstellt.

EPH + γ-CD: Auch in diesem Fall erfahren die drei inneren CD-Protonen die für einen Einschlußkomplex typischen Verschiebungen ins höhere Feld. Jedoch sind die Wechselwirkungen zwischen dem Gastmolekül und der Hohlraumwandung bedeutend schwächer als im entsprechenden ß-CD-Komplex. Es ist anzu-

nehmen, daß der Innenraum des γ-CD einem EPH-Molekül wesentlich mehr Bewegungsmöglichkeit läßt als der des ß-CD. So ist die Stabilität des EPH-γ-CD-Komplexes als relativ gering einzuschätzen.

2.8.2. Einfluß von α-, ß- und γ-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Ephedrin

Die Reaktionsbedingungen und Angaben zur Durchführung der Untersuchungen sind dem Abschnitt 2.4. zu entnehmen. Besonders zu beachten ist, daß die Arzneistoffkonzentration in den Reaktionsansätzen von nun an stets 20 mmol/l beträgt. In den Versuchen mit CD erfolgt die Nitrosierung jeweils in Anwesenheit einer äquimolaren Menge dieses Hilfsstoffes.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit PIP, ETB und CIM verläuft die Nitrosierung von EPH langsam. Selbst nach 24 h ist die Reaktion noch nicht beendet.

Die Zusätze von CD haben bemerkenswert veränderte Reaktionsgeschwindigkeiten zur Folge. α-CD setzt die Nitrosierungsrate leicht herab, während ß- und γ-CD zu einer erstaunlichen Beschleunigung der Reaktion führen (Abb. 18). Die maximal gebildeten Nitrosaminkonzentrationen sind ebenfalls verschieden.

Besonders interessant sind die Vorgänge in Anwesenheit von ß-CD. Einerseits bewirkt ß-CD zunächst eine kräftige Steigerung der Nitrosaminsynthese, andererseits begünstigt es im weiteren Verlauf auch die Zersetzung des Reaktions-

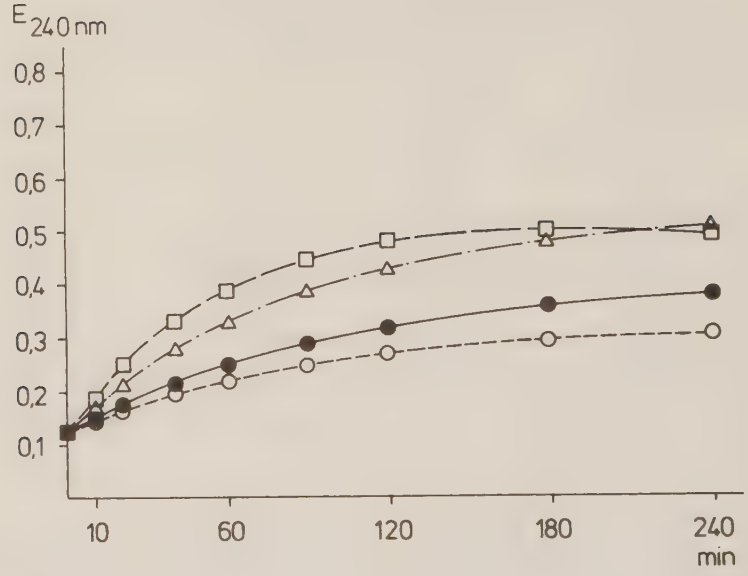


Abb. 18: In vitro-Nitrosierung von Ephedrin in Anwesenheit von Cyclodextrinen

ohne Cyclodextrin
mit α-Cyclodextrin
mit ß-Cyclodextrin
mit γ-Cyclodextrin

produktes.

Nach jeweils 120 min konnte in den Ansätzen mit ß-CD die Bildung einer kleinen Menge eines Niederschlags beobachtet werden.

Es ist festzuhalten, daß gerade diejenigen CD einen katalytischen Effekt ausüben, die in Lösung mit EPH einen Einschlußkomplex bilden.

2.8.3. Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin

Angeregt durch die beobachteten katalytischen Wirkungen des ß- und γ-CD wurden Überlegungen angestellt, ob die erhöhte Reaktionsbereitschaft des EPH mit dem "Enzymmodell der CD" erklärt werden kann. BENDER und KOMIYAMA (65) führen eine Vielzahl anderer Reaktionen an, die durch unsubstituierte CD katalysiert werden. Der entscheidende Schritt dabei ist in vielen Fällen eine Wechselwirkung der sekundären Hydroxylgruppen des CD (a-Seite, siehe Abb. 9) mit bestimmten Strukturen des Gastmoleküls. Es wäre möglich, daß die CD-katalysierte N-Nitrosierung von EPH auf einem ähnlichen Mechanismus beruht. Welche Bedeutung den Hydroxylgruppen dabei zukommt, könnten Versuche mit chemisch modifizierten CD zeigen. Beispielsweise läßt sich durch die gezielte Veretherung entweder der primären oder der sekundären Hydroxyle der Effekt der jeweils verbleibenden nichtsubstituierten Gruppe gesondert betrachten.

In der Literatur ist eine größere Zahl verschiedener CD-

Derivate aufgeführt. Einen umfassenden Überblick geben CROFT und BARTSCH (130). In einer Studie über die Konformation von O-methylierten CD beschrieben CASU et al. (131) die Synthese des Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-CD (DIMEB)(Abb. 19). Diese Verbindung befand sich auch unter denjenigen alkylierten Derivaten des ß-CD, die von BERGERON et al. (132) zur Erhöhung des hydrophoben Charakters der CD hergestellt wurden. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der ^{13}C-NMR-Untersuchung verschiedener methylierter Derivate des ß-CD veröffentlichten SZEJTLI et al. (109) eine verbesserte Synthesevorschrift für DIMEB.

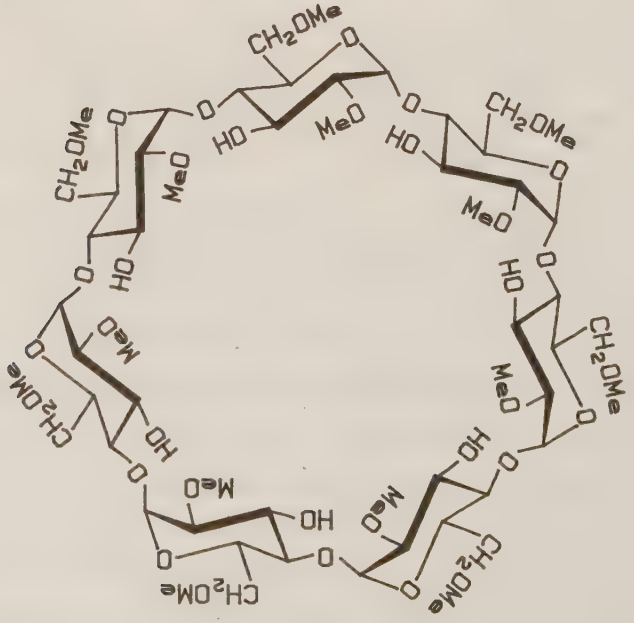


Abb. 19: Die chemische Struktur des Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin (Me = CH_3)

DIMEB ist in kaltem Wasser bis zu 50% löslich (133). In Gegenwart von DIMEB läßt sich eine Vielzahl schwerlöslicher Verbindungen in Lösung bringen (134). SZEJTLI (135) nennt für einige Steroide um den Faktor 40 - 1200 erhöhte Wasserlöslichkeiten. Die DIMEB-Komplexe des Cholecalciferols (Vitamin D_3)(38) und des Menadions (Vitamin K_3)(136) sind im Gegensatz zu den entsprechenden ß-CD-Komplexen in Wasser ausreichend löslich, um NMR-Messungen zur Bestimmung der in Lösung vorliegenden Strukturen durchführen zu können.

Die partielle Methylierung des ß-CD erhöht nicht nur die Löslichkeit lipophiler Verbindungen, sondern kann anscheinend gleichzeitig deren parenterale Toxizität vermindern. PITHA und SZENTE (137) fanden einen abgeschwächten Verlauf der Hypervitaminose A bei Mäusen, denen DIMEB parenteral verabreicht worden war. Wahrscheinlich wurde der Blutspiegel des freien Vitamins durch Komplexierung mit DIMEB soweit gesenkt, daß eine Abnahme der Toxizität resultierte.

Ein interessanter pharmazeutischer Aspekt ist auch die jüngst festgestellte Stabilitätsverbesserung, die einige empfindliche Arzneistoffe durch DIMEB in wässriger Lösung erfahren. Dies gilt beispielsweise für das Prostaglandin E_2 (43).

Auf Grund der vielen vorteilhaften Eigenschaften des DIMEB sieht SZEJTLI (135) in dieser Substanz einen möglichen parenteralen Arzneistoffträger der Zukunft.

Im DIMEB ist die b-seitige Hohlraumöffnung durch Methylgruppen stark verengt. Die Form des Moleküls ähnelt einer offenen Halbkugel. Die Bildung eines Einschlußkomplexes zwischen

EPH und DIMEB kann daher nur auf der a-Seite des Wirtsmoleküls erfolgen. Es ist anzunehmen, daß die aromatische Gruppe des Gastmoleküls dabei bis an die O-6-Methylgruppen vordringt. Daraus sollten stärkere hydrophobe Bindungskräfte im Innern des Hohlraums resultieren als im entsprechenden ß-CD-Komplex. Das in der herausragenden Seitenkette befindliche Stickstoffatom könnte dann nur mit Strukturen der a-Seite des DIMEB in Wechselwirkung treten.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß an einem zunächst noch hypothetischen Einschlußkomplex zwischen EPH und DIMEB der Einfluß der Komplexstabilität und -struktur auf die Nitrosierbarkeit des EPH in Anwesenheit von CD genauer studiert werden kann. Es erschien daher sehr nützlich, die Untersuchungen auf das DIMEB auszudehnen.

Die Synthese des DIMEB erfolgte nach den Angaben von SZEJTLI et al. (109). Die Ausbeute betrug 28,2% der Theorie. Die erhaltenen Kristalle schmelzen bei 311°C.

2.8.3.1. NMR-Untersuchungen

Zur Beurteilung der Komplexbildung zwischen EPH und DIMEB wurde das ^{1}H-NMR-Spektrum einer äquimolaren Mischung beider Komponenten in D_2O aufgenommen. Beim Vergleich der Protonenresonanzen des DIMEB mit den entsprechenden in Abwesenheit von EPH aufgenommenen Werten ergeben sich bei der Mischung Verschiebungen der drei inneren DIMEB-Protonen zu kleineren ppm-Werten (Tab. 10). Die Existenz eines EPH-DIMEB-Einschluß-

komplexes in Lösung steht damit außer Frage.

Tabelle 10: Einfluß von Ephedrin (EPH) auf das Protonenresonanzspektrum von Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin (DIMEB), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	DIMEB ppm	EPH + DIMEB ppm	Differenz ppm
H-1	5,1805	5,1860	0,0055
H-2	3,5985	3,6041	0,0056
Me-2	3,5376	3,5453	0,0107
H-3	3,9232	3,8824	-0,0408
H-4	3,4535	3,4616	0,0081
H-5	3,7093	3,7082	-0,0011
H-6	3,7877	3,7537	-0,0340
Me-6	3,3510	3,3659	0,0149

2.8.3.2. Einfluß von Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Ephedrin

Die Untersuchungen mit DIMEB wurden stets in gleicher Weise wie mit α-, ß- und γ-CD durchgeführt, um die Effekte der vier eingesetzten CD auf die Nitrosierbarkeit direkt miteinander vergleichen zu können.

In Anwesenheit von DIMEB erfährt die normalerweise recht langsame Umsetzung des EPH mit Nitrit eine beträchtliche

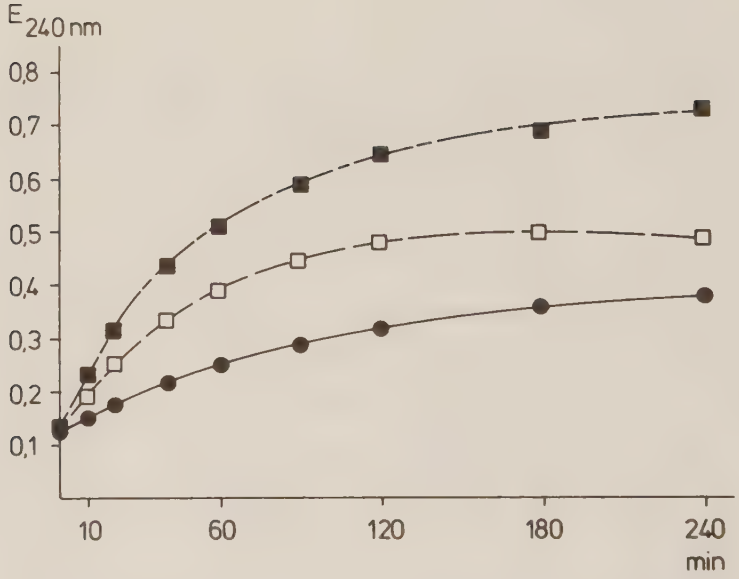


Abb. 20: In vitro-Nitrosierung von Ephedrin
in Anwesenheit von
Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin

●——————● ohne Cyclodextrin

□— —— —□ mit ß-Cyclodextrin

■— - —— -■ mit Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-
ß-Cyclodextrin

Beschleunigung (Abb. 20). Selbst im Vergleich zum ß-CD verläuft die Reaktion bedeutend schneller und mit höherer Ausbeute. Eine Begünstigung der Zersetzung des gebildeten NEPH, wie sie mit ß-CD auftritt, ist jedoch nicht zu beobachten.

Wie zuvor nachgewiesen wurde, bildet DIMEB in wässriger Lösung mit EPH einen Einschlußkomplex. Es deutet sich also auch hier ein Zusammenhang der erhöhten Nitrosierungsrate des EPH mit der Existenz eines entsprechenden Einschlußkomplexes an.

Eine Niederschlagsbildung im Reaktionsansatz wurde nicht beobachtet.

2.8.4. Reaktionskinetische Betrachtungen

Jedes der vier CD beeinflußt die Nitrosierung des EPH in charakteristischer Weise. Ein unmittelbarer Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten ist nur nach Ermittlung der Reaktionsordnungen anhand der Geschwindigkeitskonstanten möglich.

Bei Betrachtung der Reaktionsverläufe fällt sofort auf, daß die maximal gebildete Nitrosaminkonzentation unterschiedliche Werte erreicht; es existiert kein gemeinsamer "100%-Wert". Mit ß-CD kommt es außerdem zu einer deutlichen Überlagerung von Bildung und Zerfall der N-Nitrosoverbindung. In den ersten Minuten verlaufen die Reaktionen jedoch noch völlig ungestört und sollten daher in diesem Bereich einer kinetischen Betrachtung leichter zugänglich sein. Wenn in allen

Fällen dieselbe Reaktionsordnung vorliegt, lassen sich zumindest die relativen Geschwindigkeitskonstanten der fünf Nitrosierungverläufe angeben.

Für die Vorgänge in den Reaktionsansätzen wurde das nachstehende einfache Modell angenommen.

$$A \xrightarrow{k} N$$

Arzneistoff, im Reaktionsmedium gelöst — N-Nitrosoverbindung, im Reaktionsmedium gelöst

Unter der Voraussetzung, daß eine Reaktionskinetik 1. Ordnung vorliegt, kann die folgende kinetische Gleichung für die Bildung der N-Nitrosoverbindung aufgestellt werden:

$$\frac{dN}{dt} = {}^1k \cdot \frac{1}{N}$$

Nach der Integration ergibt sich:

$$\frac{N^2}{2} = {}^1k \cdot t$$

Nach dem Lambert-Beer-Gesetz besteht bei konstanten Versuchsbedingungen eine direkte Proportionalität zwischen der Konzentration und der Absorption der gelösten N-Nitrosoverbindung. Letztere wurde jedoch stets in Addition mit der Nitrit-Absorption erfaßt. Da sich die Nitrit-Konzentration im Überschuß befindet, nimmt sie während der Versuchsdauer nur wenig ab. Der Einfachheit halber darf daher von einer konstant bleibenden Nitrit-Absorption ausgegangen werden. Dieser Wert

kann dem jeweils ersten Extinktionsmeßwert ($E_{0,5\ min}$) gleichgesetzt werden, weil 0,5 min nach Reaktionsbeginn die Konzentration der N-Nitrosoverbindung noch praktisch Null ist (Abb. 18).

Die Beziehung zwischen der Konzentration der N-Nitrosoverbindung und den photometrischen Meßwerten läßt sich in folgender Gleichung zusammenfassen:

$$N = f \cdot (E_t - E_{0,5\ min})$$

Eingesetzt in die obige Gleichung ergibt sich:

$$(E_t - E_{0,5\ min})^2 = \frac{2}{f} \cdot {}^1k \cdot t$$

E_t = Extinktion bei 240 nm zur Zeit t
f = Proportionalitätsfaktor nach Lambert und Beer
${}^1k$ = Nitrosierungsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung

Demnach erscheinen Reaktionen 1. Ordnung in der grafischen Darstellung der quadratischen Differenzen, $(E_t - E_{0,5\ min})^2$, gegen die Zeit als Ursprungsgeraden, deren Steigungen im Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten stehen.

Während der ersten 90 min erfolgt die Nitrosierung des EPH in allen Fällen als Prozeß 1. Ordnung (Abb. 21). Nach dieser Zeit liegt in Anwesenheit von ß-CD kein linearer Verlauf mehr vor. In den vier anderen Fällen kommt es innerhalb

der nächsten 60 min zu einer plötzlichen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Vermutlich wird die Bildungsreaktion von einer ebenfalls konstanten Zersetzungsreaktion überlagert.

Aus den Geradensteigungen zu Reaktionsbeginn wurde das nachstehende Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten ermittelt:

$$k_{\alpha} : k_{ohne} : k_{\gamma} : k_{\beta} : k_{DIMEB} = 0,6 : 1 : 2,3 : 3,4 : 7,4$$

Den größten Effekt auf die Nitrosierbarkeit des EPH hat das DIMEB. Es setzt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 7,4 herauf.

Alle fünf Reaktionsverläufe waren zu fast jeder Probenahmezeit voneinander hochsignifikant verschieden: $n=6$, $P < 0,001$. Die Ausnahmen waren: 10 min (ohne CD/α-CD; $P > 0,1$), 180 min (β-/γ-CD; $P < 0,02$) und 240 min (β-/γ-CD; $P > 0,05$).

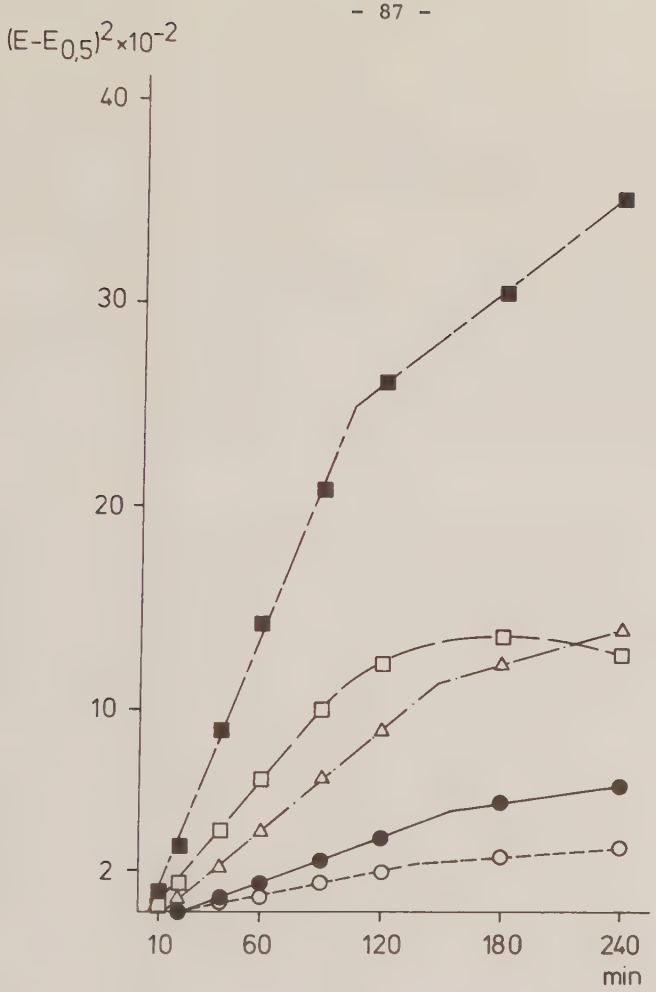


Abb. 21: In vitro-Nitrosierung von Ephedrin in Anwesenheit von Cyclodextrinen

ohne Cyclodextrin

mit α-Cyclodextrin

mit ß-Cyclodextrin

mit γ-Cyclodextrin

mit Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin

2.8.5. Diskussion

Die Umsetzung von EPH mit Nitrit wird durch ß-CD, γ-CD und DIMEB signifikant katalysiert. Parallel dazu verfügen diese drei CD über die Fähigkeit, in wässriger Lösung mit EPH einen Einschlußkomplex zu bilden. Offenbar resultiert die veränderte Reaktivität des EPH unmittelbar aus diesem Einschlußzustand. Dabei ist davon auszugehen, daß die hydrophile Aminogruppe des EPH stets außerhalb des Hohlraums der CD lokalisiert ist.

Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Erklärung der reaktionsbeschleunigenden Wirkung der drei CD. Denkbar wäre eine Basizitätsveränderung am Stickstoffatom. Diese könnte entweder durch eine Elektronenverschiebung innerhalb des Gastmoleküls oder durch eine Wechselwirkung mit Strukturen des äußeren Randbereichs der CD hervorgerufen werden. Viel wahrscheinlicher erscheint mir jedoch, daß den Parametern Komplexstabilität und -löslichkeit die entscheidende Rolle beim Zustandekommen der gefundenen Effekte zukommt. Anlaß zu dieser Vermutung geben zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen mit ß-CD und DIMEB. Die methylierte Verbindung verfügt über den hydrophoberen Hohlraum und damit über die Fähigkeit, einen stabileren EPH-Komplex zu bilden als es das ß-CD vermag. Zugleich ist die katalytische Wirkung des DIMEB stärker als die des ß-CD. Auch im Vergleich mit dem Effekt des γ-CD findet sich diese Parallele zur Komplexstabilität. Als Ergebnis der NMR-Untersuchung ist die Stabilität des EPH-γ-CD-Einschlußkomplexes als relativ gering einzuschätzen. Tatsächlich

beschleunigt γ-CD die Umsetzung von EPH mit Nitrit auch nicht in dem Maße wie ß-CD. Also nimmt die Nitrosierbarkeit des EPH in Gegenwart von CD mit steigender Stabilität der entsprechenden Einschlußkomplexe zu.

Die weiteren Überlegungen stützen sich auf die Beobachtung der Bildung eines Niederschlags in den Reaktionsansätzen mit ß-CD. Da die Ausfällung erst nach jeweils 120 min einsetzte, muß es sich um ein Reaktionsprodukt handeln. Reines NEPH liegt jedoch vermutlich nicht vor, denn in keinem der anderen Ansätze, auch nicht in dem ohne CD-Zusatz, wurde ein Niederschlag beobachtet. Wesentlich wahrscheinlicher ist, daß eine feste NEPH-ß-CD-Einschlußverbindung entstanden ist. Diese Möglichkeit ist durchaus vorstellbar, denn im Reaktionsmedium gelöstes CD könnte grundsätzlich sowohl mit dem Amin als auch mit dem entstandenen Nitrosamin in Wechselwirkung treten. Mit der Umwandlung eines sekundären Amins in das entsprechende Nitrosamin ist auch eine Polaritätsabnahme verbunden. Ist also das Amin bereits ein geeignetes Gastmolekül für ein bestimmtes CD, dann sind die apolaren Bindungskräfte zwischen dem Nitrosamin und diesem CD vermutlich noch stärker. Dadurch könnte das CD in das Konzentrationsgefälle zwischen freiem Amin und freiem Nitrosamin eingreifen, indem es das Nitrosamin bevorzugt komplexiert. Beim Überschreiten der Löslichkeitsgrenze schließlich würde die Nitrosamin-CD-Einschlußverbindung ausfallen und damit die Konzentration des im Reaktionsmedium gelösten Nitrosamins gering halten. Die reaktionsbeschleunigende Wirkung des CD käme in diesem Fall über die Aufrechterhaltung eines

stärkeren Konzentrationsgefälles zustande. Mit diesem Mechanismus wäre der starke Effekt des ß-CD zu erklären. Die Reaktionsabläufe in Anwesenheit von γ-CD und DIMEB zeigen hingegen, daß die katalytische Wirkung eines CD nicht an die Bildung einer festen Nitrosamin-CD-Einschlußverbindung gebunden ist. Es ist anzunehmen, daß auch zwischen NEPH und γ-CD bzw. DIMEB Einschlußkomplexe gebildet werden, diese jedoch auf Grund ihrer guten Löslichkeit nicht als feste Addukte kristallisieren. Wenn also die Komplexbildung in der Reaktionslösung für das Zustandekommen eines katalytischen Effekts ausreicht, dann hat sicher auch das Verhältnis der Bildungskonstanten K_B ($K_B = \frac{1}{K_D}$, vgl. 1.2.) des EPH- und des NEPH-Komplexes einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit im Nitrosierungsansatz. Damit dieser Aspekt fundiert weiterverfolgt werden kann, ist zunächst die Zusammensetzung des in Anwesenheit von ß-CD ausgefallenen Produktes aufzuklären.

2.8.6. NMR-Untersuchung des N-Nitrosoephedrin-ß-Cyclodextrin-Addukts

Die aus einem normalen Reaktionsansatz (2,2 ml) verfügbare Substanzmenge war für eine NMR-Untersuchung zu gering. Erst nach der Verdoppelung des Ansatzvolumens wurde eine ausreichende Ausbeute von etwa 10 mg eines weißen, schwach wasserlöslichen Pulvers erhalten. In der folgenden NMR-Untersuchung konnte D_2O als Lösungsmittel verwendet werden.

Es erschien sinnvoll, als Vergleich auch das Spektrum einer äquimolaren Mischung aus NEPH und ß-CD heranzuziehen. Dazu wurde das reine Nitrosamin benötigt. Die Darstellung des NEPH erfolgte nach den Angaben von KINAWI und SCHUSTER (112). Die erhaltene schwachgelbe, fast farblose, kristalline Substanz schmilzt bei 89°C.

Von den nachstehenden Proben wurden die ^{1}H-NMR-Spektren aufgenommen:

A) ß-CD
B) äquimolare Mischung aus EPH und ß-CD
C) ausgefallenes Produkt
D) äquimolare Mischung aus NEPH und ß-CD

Die Spektren A und B dienen der Zuordnung sämtlicher Peaks der Spektren C (Abb. 22) und D (Abb. 23). Auf diese Weise lassen sich auch Signalverschiebungen, die auf der Umwandlung vom Amin zum Nitrosamin beruhen, ermitteln.

Die Protonen der beiden Methylgruppen treten nach der Nitrosierung bei höheren ppm-Werten in Resonanz als zuvor (sek. CH_3-Gruppe: $\Delta\delta$ = +0,04 ppm, N-CH_3-Gruppe: $\Delta\delta$ = +0,15 ppm). Hingegen werden die Signale des Aromaten durch den elektronenziehenden Effekt der Nitrosylgruppe kaum beeinflußt.

Hinsichtlich ihrer Signalpositionen sind die Spektren C und D identisch. Damit ist bewiesen, daß es sich bei dem ausgefallenen Produkt um ein NEPH-ß-CD-Addukt handelt.

Aus der Integrationskurve des Spektrums C läßt sich ein Molverhältnis von 1:1 zwischen NEPH und ß-CD im Addukt bestimmen. Dieses Ergebnis spricht für das Vorliegen eines Einschlusses.

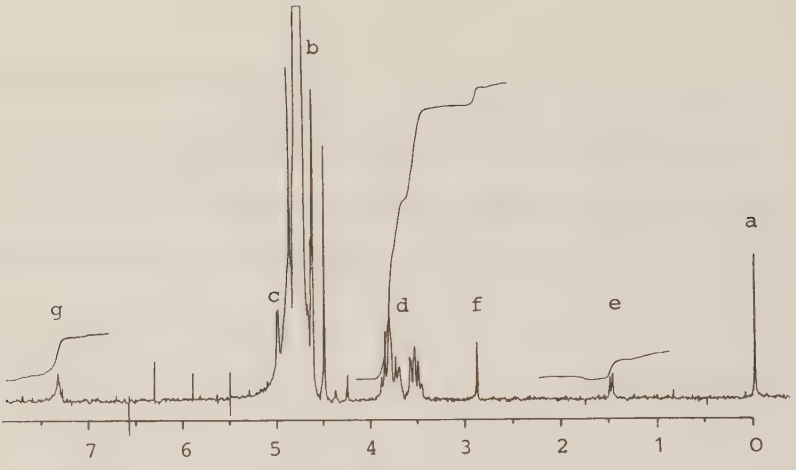


Abb. 22

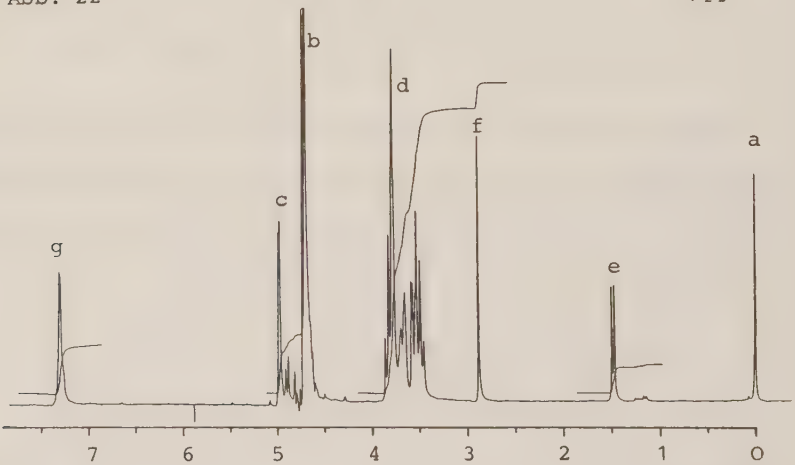


Abb. 23

Abb. 22: ^{1}H-NMR-Spektrum des N-Nitrosoephedrin-ß-Cyclodextrin-Addukts, aufgenommen in D_2O

Abb. 23: ^{1}H-NMR-Spektrum der äquimolaren Mischung aus N-Nitrosoephedrin und ß-Cyclodextrin, aufgenommen in D_2O

a: TSP; b: HDO und H_2O;
ß-CD-Signale: c: H-1, d: H-2 bis H-6;
NEPH-Signale: e: sek. CH_3-Gruppe, f: N-CH_3-Gruppe, g: Aromat

2.8.7. Vergleich der Bildungskonstanten der ß-Cyclodextrin-Komplexe des Ephedrins und des N-Nitrosoephedrins

Aus der katalytischen Wirkung des EPH-komplexierenden ß-CD einerseits und aus der Bildung einer festen NEPH-ß-CD-Einschlußverbindung andererseits ist zu schließen, daß während der Reaktion sowohl der Amin- als auch der entsprechende Nitrosaminkomplex vorliegen. Beide Gastmoleküle sind zwar annähernd gleichgroß, aber von unterschiedlicher Polarität. Mit der Nitrosierung des Amins ist ein starker Basizitätsrückgang verbunden, in dessen Folge die Salzbildung praktisch völlig unterdrückt wird. Aus diesem Grund ist das NEPH die hydrophobere Verbindung und vermutlich auch das bevorzugte Gastmolekül des ß-CD in Lösung. Es stellte sich daher die Frage, ob die CD-induzierte Steigerung der Nitrosierungsgeschwindigkeit darauf zurückzuführen ist, daß der NEPH-CD-Komplex sehr viel stabiler ist als der entsprechende EPH-CD-Komplex.

Auf Grund der begrenzten Stabilität des NEPH ist die Bestimmung der Bildungskonstanten K_B des NEPH-ß-CD-Komplexes nach der Löslichkeitsmethode (122) nicht möglich. Bei der Anwendung eines kernresonanzspektroskopischen Verfahrens besteht der Vorteil einer wesentlich kürzeren Versuchsdauer.

Bisher wurde nur das EPH selbst auf sein Komplexbildungsverhalten gegenüber CD mittels ^{1}H-NMR untersucht. Dabei war der Einschluß des EPH durch eine meßbare Verschiebung ($\Delta\delta$) der in den Hohlraum gerichteten CD-Protonen zu kleineren ppm-Werten infolge der diamagnetischen Anisotropie des Aromaten

nachweisbar. Der gleiche Effekt sollte auch beim Einschluß des NEPH auftreten.

Die Substrat-induzierten Verschiebungen der CD-Protonen lassen sich jedoch nicht nur zum Nachweis, sondern auch zur Abschätzung der Stabilität eines CD-Komplexes heranziehen. So berichten THAKKAR und DEMARCO (121) von einer Korrelation zwischen den Bildungskonstanten K_B, bestimmt mit der Löslichkeitsmethode (122), und den Verschiebungen ($\Delta\delta$) des H-5 bei mehreren Barbiturat-ß-CD-Komplexen. Die Autoren einer jüngeren Studie über die CD-Komplexe des Bencyclans gehen sogar von einer Proportionalität zwischen der Stärke der Verschiebungen und dem Prozentsatz des an Bencyclan gebundenen CD aus (116). In entsprechender Weise sollte sich auch die Stabilität des EPH-ß-CD- und des NEPH-ß-CD-Komplexes abschätzen lassen. Im Falle gleicher Versuchsbedingungen ist anzunehmen, daß die EPH-induzierten Verschiebungen zu den NEPH-induzierten Verschiebungen im Verhältnis der Bildungskonstanten (K_B(EPH-ß-CD)/K_B(NEPH-ß-CD)) stehen.

In der anschließenden Untersuchung wurden die Substrat-induzierten Verschiebungen ($\Delta\delta$) bei jeweils vier verschiedenen Molverhältnissen zwischen Substrat und ß-CD ermittelt:

a) 0,1 : 1 b) 0,25 : 1 c) 0,5 : 1 d) 1 : 1

Eine weitere Erhöhung des Substrat/ß-CD-Verhältnisses wäre nicht sinnvoll, da EPH und ß-CD in den Nitrosierungsversuchen stets in äquimolaren Mengen eingesetzt wurden. Die vier gewählten Verhältnisse sollten gleichzeitig einen Einblick in die Komplexbildungsabläufe gestatten.

Zur Vorbereitung der Proben waren äußerst geringe Substanzmengen (0,10 - 5,68 mg) abzuwiegen. Daher mußte davon ausgegangen werden, daß die eingewogenen Molverhältnisse stärker von den angestrebten Werten abweichen würden. Aus diesem Grund wurden die tatsächlich erreichten Molverhältnisse aus den Integralen eindeutiger Substrat- und ß-CD-Peaks berechnet.

Alle Proben wurden erst unmittelbar vor der Kernresonanzmessung in 0,5 ml D_2O gelöst. Als Vergleich diente stets dasselbe Spektrum des ß-CD. Die Substrat-induzierten Verschiebungen ($\Delta\delta$) des ß-CD wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\Delta\delta \text{ (ppm)} = \delta_{\text{Substrat + ß-CD}} \text{ (ppm)} - \delta_{\text{freies ß-CD}} \text{ (ppm)}$$

2.8.7.1. NMR-Untersuchung des Ephedrin-ß-Cyclodextrin-Systems

In Tab. 11 sind die tatsächlich erhaltenen Molverhältnisse der aus L-Ephedrinsulfat und ß-CD zusammengesetzten Proben aufgeführt. Der Komplexbildungsverlauf zwischen EPH und ß-CD ist aus Abb. 24 und Tab. 12 ersichtlich.

Tabelle 11: EPH-ß-CD-Proben

Proben-bezeichnung	Molverhältnis EPH : ß-CD
E 0,1	0,13 : 1
E 0,25	0,25 : 1
E 0,5	0,43 : 1
E 1,0	0,84 : 1

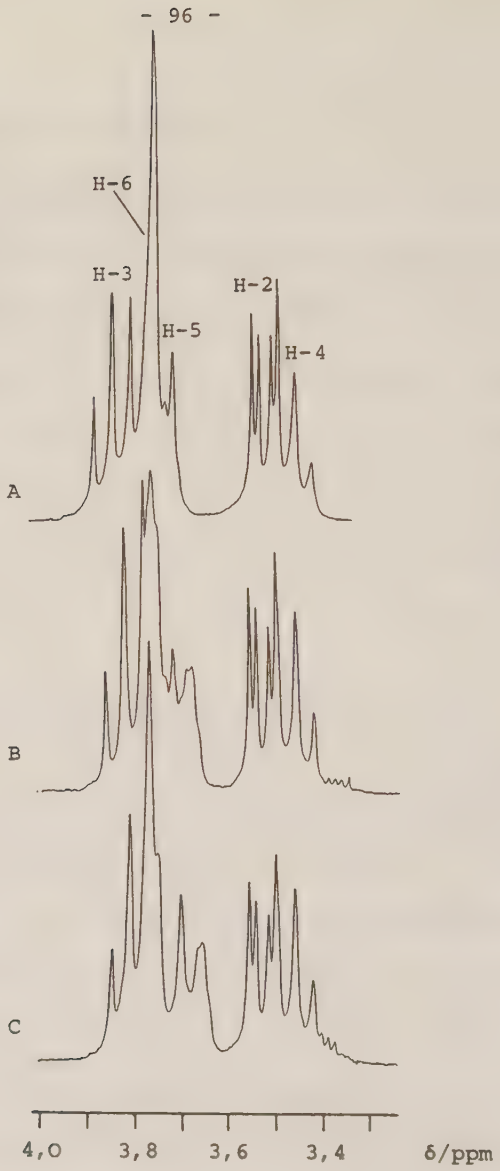


Abb. 24: ^{1}H-NMR-Spektren von ß-Cyclodextrin - H-2 bis H-6 - in Anwesenheit verschiedener Mengen von Ephedrin, aufgenommen in D_2O,
Molverhältnis Ephedrin : ß-Cyclodextrin:
A) 0 : 1 B) 0,43 : 1 C) 0,84 : 1

Tabelle 12: Ephedrin-induzierte Verschiebungen ($\Delta\delta$) des ß-Cyclodextrins in ppm

ß-CD-Proton	Probe E 0,1	E 0,25	E 0,5	E 1,0
H-1	-0,0013	0,0001	-0,0007	0,0055
H-2	0,0036	0,0041	0,0067	0,0130
H-3	-0,0091	-0,0161	-0,0266	-0,0322
H-4	-0,0009	-0,0005	0,0003	0,0064
H-5	-0,0092	-0,0161	-0,0412	-0,0569
H-6	-0,0067	-0,0109	0,0004	0,0118

2.8.7.2. NMR-Untersuchung des N-Nitrosoephedrin-ß-Cyclodextrin-Systems

In Tab. 13 sind die tatsächlich erhaltenen Molverhältnisse der aus NEPH und ß-CD zusammengesetzten Proben aufgeführt. Der Komplexbildungsverlauf zwischen NEPH und ß-CD ist aus Abb. 25 und Tab. 14 ersichtlich.

Tabelle 13: NEPH-ß-CD-Proben

Proben-bezeichnung	Molverhältnis NEPH : ß-CD
N 0,1	0,24 : 1
N 0,25	0,33 : 1
N 0,5	0,61 : 1
N 1,0	1,17 : 1

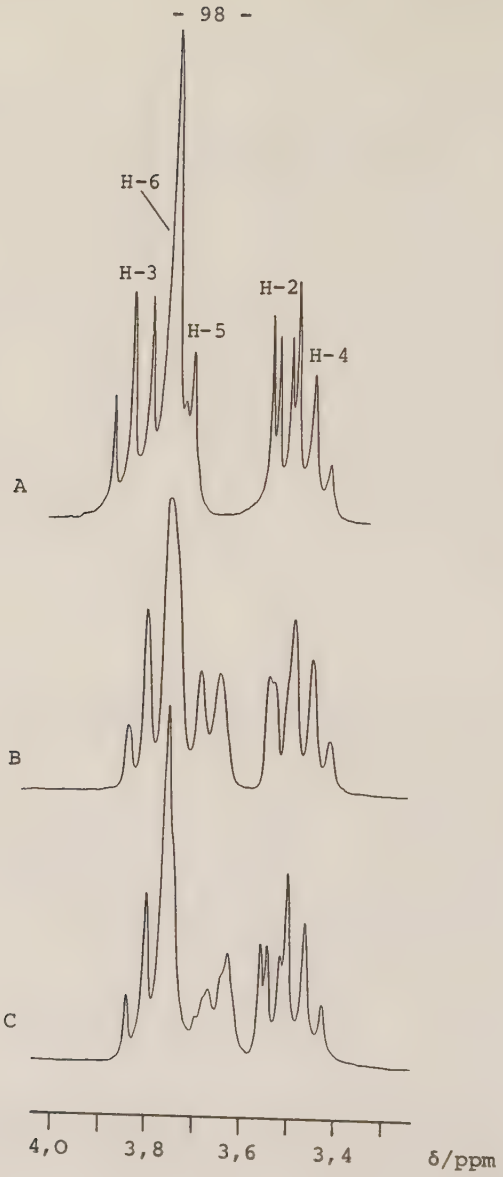


Abb. 25: ^{1}H-NMR-Spektren von ß-Cyclodextrin - H-2 bis H-6 - in Anwesenheit verschiedener Mengen von N-Nitrosoephedrin, aufgenommen in D_2O,
Molverhältnis N-Nitrosoephedrin : ß-Cyclodextrin:
A) 0 : 1 B) 0,61 : 1 C) 1,17 : 1

Tabelle 14: N-Nitrosoephedrin-induzierte Verschiebungen (Δδ) des ß-Cyclodextrins in ppm

ß-CD-Proton	Probe N 0,1	N 0,25	N 0,5	N 1,0
H-1	0,0075	0,0005	0,0016	0,0117
H-2	0,0077	0,0063	0,0125	0,0200
H-3	-0,0083	-0,0202	-0,0273	-0,0343
H-4	0,0077	0,0030	0,0075	0,0171
H-5	-0,0159	-0,0403	-0,0542	-0,0779
H-6	0,0133	0,0015	0,0067	0,0100

2.8.7.3. Diskussion

Sowohl in Tabelle 12 als auch in Tabelle 14 zeigen H-3 und H-5 parallel zum Substratanteil zunehmende Verschiebungen zu kleineren ppm-Werten. Beide Substrate beeinflussen H-5 stärker als H-3, was auf die gleiche Orientierung des EPH und des NEPH im jeweiligen ß-CD-Komplex hinweist. H-6 wird kaum verschoben. Offenbar nähert sich der Aromat bei der Komplexbildung zunächst der schmaleren primären Hydroxylseite (b-Seite), passiert H-6 und erreicht seine Endposition dicht hinter H-5.

Als erstes Ergebnis dieser NMR-Untersuchungen steht fest, daß NEPH mit ß-CD in wässriger Lösung einen Einschlußkomplex bildet. Bisher war nur die Existenz einer festen NEPH-ß-CD-Einschlußverbindung nachgewiesen (siehe 2.8.6.).

Hauptzweck dieser Untersuchungen war jedoch, einen Ein-

blick in das Verhältnis der Bildungskonstanten des EPH-ß-CD- und des NEPH-ß-CD-Komplexes zu erhalten. Zur besseren Übersicht wurden die EPH- und die NEPH-induzierten Verschiebungen ($\Delta\delta$) von H-3 und H-5 gegen das Substrat/ß-CD-Verhältnis aufgetragen (Abb. 26). Als Bezugspunkt diente H-1, dessen Verschiebung $\Delta\delta$ = 0 ppm gesetzt wurde.

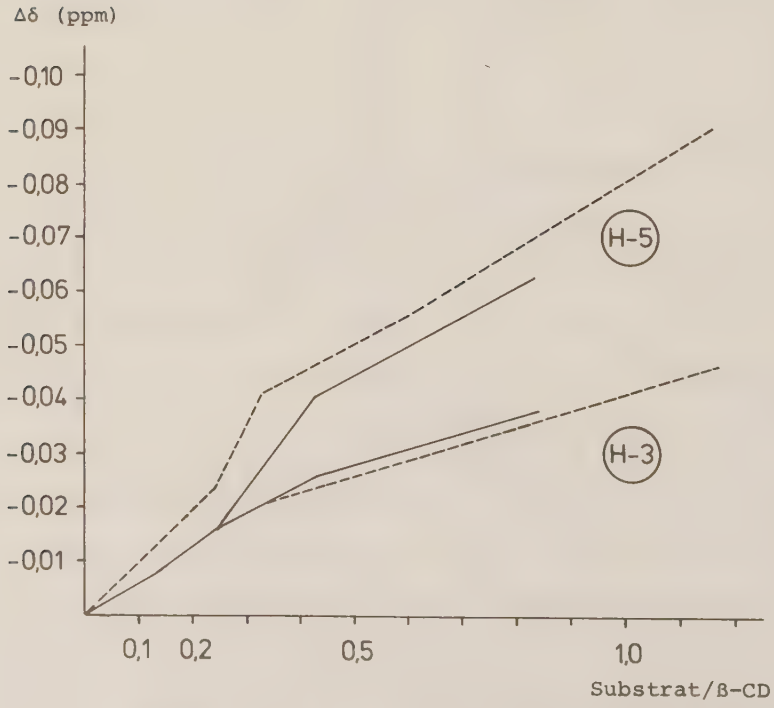


Abb. 26: Ephedrin- und N-Nitrosoephedrin-induzierte Verschiebungen ($\Delta\delta$) von H-3 und H-5 des ß-Cyclodextrin

——— = Ephedrin, ----- = N-Nitrosoephedrin

Während H-3 durch beide Substrate gleichermaßen beeinflußt wird, zeichnet sich bei H-5 eine etwas stärkere Wechselwirkung mit dem N-Nitrosoderivat ab. In Bezug auf die Stabilität dürfte der NEPH-ß-CD-Komplex dem EPH-ß-CD-Komplex daher leicht überlegen sein.

Damit bestätigt sich die Annahme, daß die durch CD beschleunigte Nitrosierung eines sekundären Amins mit einer relativ hohen Stabilität des Nitrosamin-CD-Komplexes einhergeht.

2.9. Mefenorex

MEF erscheint auf Grund seiner Molekülstruktur gut geeignet, um weitere Informationen über die Gesetzmäßigkeiten der beim EPH aufgetretenen Effekte der CD zu erhalten. Es unterscheidet sich vom EPH lediglich in zwei Strukturelementen: MEF hat keine Hydroxylgruppe, und am Stickstoffatom befindet sich an Stelle der Methyl- eine 3-Chlorpropylgruppe. Die Verbindung ist daher geringfügig hydrophober als EPH, was ähnliche Effekte der CD wie beim EPH erwarten läßt.

Vom MEF sind bisher weder CD-Komplexe noch ein N-Nitrosoderivat beschrieben worden.

Die Reaktionsbereitschaft der Substanz gegenüber Nitrit konnte bereits im Vorversuch festgestellt werden.

Versuche zur Darstellung einer festen MEF-CD-Einschlußverbindung blieben erfolglos. Zur Bestimmung der Komplexbildung zwischen MEF und CD in Lösung wurden die nachstehenden NMR-Untersuchungen durchgeführt.

2.9.1. NMR-Untersuchungen

Es wurden die ^{1}H-NMR-Spektren äquimolarer Mischungen des MEF mit α-, ß-, γ-CD und DIMEB in D_2O aufgenommen. In den Tabellen 15 bis 17 sind die MEF-induzierten Protonenresonanzen der CD den in Abwesenheit von MEF ermittelten Vergleichswerten gegenübergestellt. Auf die tabellarische Auswertung des Spektrums der MEF-ß-CD-Mischung muß verzichtet werden. In Anwesenheit

von MEF wandert die Signalgruppierung der inneren Protonen des ß-CD so weit ins höhere Feld, daß es zu Überlappungen mit MEF-Signalen kommt. So ist die Existenz eines MEF-ß-CD-Komplexes bereits aus diesem Vorgang ersichtlich.

Tabelle 15: Einfluß von Mefenorex (MEF) auf das Protonenresonanzspektrum von α-Cyclodextrin (α-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	α-CD ppm	MEF + α-CD ppm	Differenz ppm
H-1	4,9462	4,9641	0,0179
H-2	3,5188	3,5425	0,0237
H-3	3,8998	3,8747	-0,0251
H-4	3,4898	3,5063	0,0165
H-5	3,7449	3,7588	0,0139
H-6	3,8079	3,8163	0,0084

Tabelle 16: Einfluß von Mefenorex (MEF) auf das Protonenresonanzspektrum von γ-Cyclodextrin (γ-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	γ-CD ppm	MEF + γ-CD ppm	Differenz ppm
H-1	5,1268	5,1375	0,0107
H-2	3,6719	3,6889	0,0170
H-3	3,9443	3,9421	-0,0022
H-4	3,5976	3,6093	0,0177
H-5	3,8503	3,8413	-0,0090
H-6	3,8821	3,8865	0,0044

Tabelle 17: Einfluß von Mefenorex (MEF) auf das Protonenresonanzspektrum von Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin (DIMEB), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	DIMEB ppm	MEF + DIMEB ppm	Differenz ppm
H-1	5,1686	5,1880	0,0194
H-2	3,5692	3,5982	0,0290
Me-2	3,5104	3,5430	0,0326
H-3	3,9068	3,8311	-0,0757
H-4	3,4351	3,4604	0,0253
H-5	3,6893	3,6721	-0,0172
H-6	3,7923	3,6845	-0,1078
Me-6	3,3295	3,3519	0,0224

MEF + α-CD: Nur H-3 befindet sich im Abschirmungsbereich der aromatischen Gruppe des MEF. Es handelt sich offenbar um den partiellen Einschluß des MEF-Moleküls in der a-seitigen Hohlraumhälfte des α-CD.

MEF + γ-CD: Es liegt ein echter Einschlußzustand vor. Jedoch ist die Stabilität dieses Komplexes auf Grund der nur schwachen Beeinflussung von H-3 und H-5 durch das Gastmolekül als relativ gering einzuschätzen.

MEF + DIMEB: H-3 und H-6 liefern stark ins höhere Feld verschobene Signale. Demnach liegt ein sehr stabiler Einschlußkomplex vor.

2.9.2. Einfluß von α-, ß-, γ- und Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Mefenorex

Ohne Zusatz von CD reagiert MEF mit Nitrit zunächst zögernd, nach 60 min aber dann doch zu einer deutlich erfaßbaren Nitrosaminkonzentration (Abb. 27). Unmittelbar darauf zerfällt das Reaktionsprodukt wieder.

α-CD hat keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit, mit der sich MEF und Nitrit umsetzen. Es scheint lediglich einen schwachen stabilisierenden Effekt auf das Nitrosamin auszuüben.

In Gegenwart von ß-, γ-CD und DIMEB wird MEF wesentlich schneller und mit höherer Ausbeute nitrosiert. Die methylierte Verbindung hat wieder den stärksten Einfluß. Schon 40 min nach Reaktionsbeginn ist das sehr hohe Maximum der Nitrosaminkonzentration erreicht. Im weiteren Verlauf stabilisiert sich jedoch ein um etwa 20% niedrigerer Wert. ß- und γ-CD bewirken ebenfalls bemerkenswerte Steigerungen der Nitrosierbarkeit des MEF. Während das Reaktionsprodukt in Anwesenheit von γ-CD keinerlei Instabilität zeigt, deutet sich in Anwesenheit von ß-CD ein beginnender Zerfallsprozeß an.

In allen Ansätzen mit ß- und γ-CD bildete sich stets nach 10 min ein Niederschlag. Dieser war jedoch in beiden Fällen in der 1:125 verdünnten Photometrierlösung (siehe 2.4.4.) wieder löslich. Vermutlich handelt es sich bei den Niederschlägen um die entsprechenden CD-Einschlußverbindungen des NMEF.

Damit traten bei der Nitrosierung von MEF die gleichen Effekte auf, die bei den Versuchen mit EPH beobachtet worden waren. Es bestätigt sich die Vermutung, daß eine Korrelation

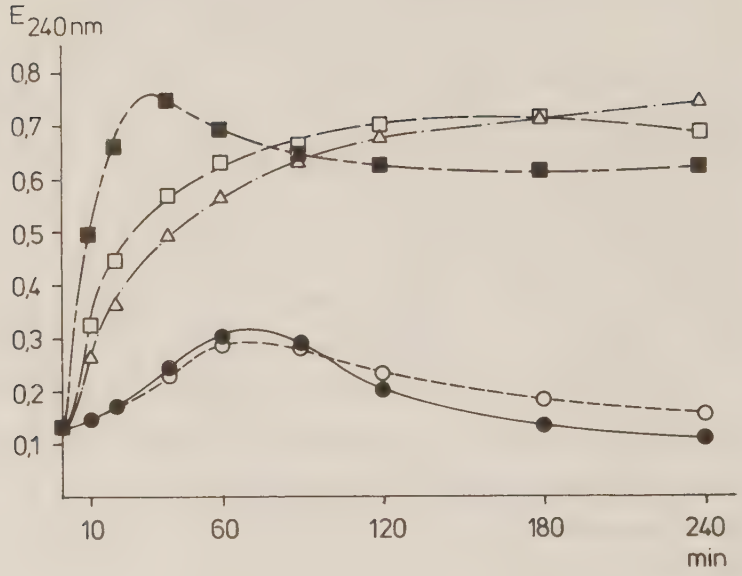


Abb. 27: In vitro-Nitrosierung von Mefenorex in Anwesenheit von Cyclodextrinen

●——● ohne Cyclodextrin

○--------○ mit α-Cyclodextrin

□— —□ mit ß-Cyclodextrin

△—·—·—△ mit γ-Cyclodextrin

■— - —■ mit Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin

zwischen der Bildung eines Amin- bzw. Nitrosamin-CD-Einschlußkomplexes einerseits und einer erhöhten Nitrosierungsrate andererseits besteht.

Die Einflüsse des ß-, γ-CD und DIMEB waren zu fast jeder Probenahmezeit sowohl untereinander als auch vom Vergleich ohne CD-Zusatz hochsignifikant verschieden: n=6, $P < 0{,}001$.
Die Ausnahmen waren: 90 min (ß-/γ-CD/DIMEB) sowie 120 und 180 min (ß-/γ-CD). Der Reaktionsverlauf in Anwesenheit von α-CD unterschied sich erst nach 180 min hochsigifikant vom Verlauf in Abwesenheit von CD.

2.9.3. NMR-Untersuchung des N-Nitrosomefenorex-ß-Cyclodextrin-Addukts

Die verwendete Substanz wurde aus einem normalen Reaktionsansatz zur Nitrosierung von MEF in Anwesenheit von ß-CD abgetrennt. Die Reaktionszeit wurde jedoch in diesem Fall auf 30 min beschränkt, um die Erfassung von etwaigen Zersetzungsprodukten zu vermeiden.

Im trockenen Zustand liegt das Produkt als weißes Pulver vor. Da es kaum wasserlöslich ist, entfällt die Möglichkeit der Verwendung von D_2O als Lösungsmittel für die NMR-Untersuchung. Statt dessen wurde Deuterodimethylsulfoxid (DMSO-d_6) verwendet.

Folgende Proben wurden mittels ^{1}H-NMR untersucht:

A) ß-CD
B) äquimolare Mischung aus MEF und ß-CD
C) ausgefallenes ß-CD-Produkt

Das N-Nitrosoderivat des MEF ist auf Grund seiner geringen Stabilität in reiner Form nicht zugänglich. Daher ist die Aufnahme eines entsprechenden Vergleichsspektrums nicht möglich.

Mit Hilfe des Spektrums A konnten die Signale des ß-CD in den Spektren B und C wiedergefunden werden. Demnach ist intaktes ß-CD ein Bestandteil des ausgefallenen Produktes.

Beim Vergleich der Spektren B und C wurde festgestellt, daß das Spektrum C außerdem alle Protonenresonanzen des MEF (Abb. 28) enthält. Unterschiede bestehen lediglich in der Position einzelner Signale. Folgende Differenzen ($\Delta\delta = \delta_{\text{MEF-Produkt}} - \delta_{\text{MEF}}$) wurden ermittelt:

a: +2,2 ppm, b: +0,3 ppm, c: ±0 ppm, e: -0,5 ppm,
d und f: verdeckt durch CD-Signale, Aromat: ±0 ppm.

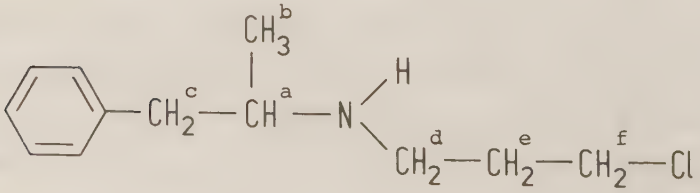


Abb. 28: Die Protonen des Mefenorex

Einen Hinweis auf das Vorliegen eines Nitrosamins in Probe C gibt die Verschiebung der Signale a und b zu höheren ppm-Werten. Dieser Vorgang kann nur mit dem elektronenziehenden Effekt der benachbarten Nitrosylgruppe erklärt werden. Die Protonen der Gruppe e zeigen den entgegengesetzten Effekt. Vermutlich kompensiert die Nitrosylgruppe den elektronegativen Effekt des Chlor-Atoms. Unbeeinflußt bleiben der Aromat und dessen Nachbargruppe c.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß es sich bei dem Niederschlag, der bei der Nitrosierung von MEF in Anwesenheit von ß-CD auftritt, um ein NMEF-ß-CD-Addukt handelt.

Nach der Integrationskurve des Spektrums C beträgt das Molverhältnis zwischen NMEF und ß-CD 0,8:1. Damit ist ein Einschlußzustand sehr wahrscheinlich.

2.9.4. NMR-Untersuchung des N-Nitrosomefenorex-γ-Cyclodextrin-Addukts

Die Darstellung und Untersuchung der Substanz wurde in entsprechender Weise wie beim ß-CD-Produkt vorgenommen. Bei der Auswertung der Spektren ergaben sich die gleichen Resultate wie beim NMEF-ß-CD-Addukt. Demzufolge bildet das N-Nitrosoderivat des MEF auch mit γ-CD ein Addukt.

Aus der Integrationskurve des Spektrums des ausgefallenen Produktes wurde ein Molverhältnis zwischen NMEF und γ-CD von von 1,1:1 bestimmt. Damit dürfte ebenfalls ein Einschluß vorliegen.

2.10. Fencamfamin

Unter dem Gesichtspunkt der schrittweisen Steigerung des hydrophoben Anteils der eingesetzten Arzneistoffe wurde für die abschließenden Versuche das FEN ausgewählt. Diese Verbindung stellt gewissermaßen den Extremfall eines "absolut hydrophoben" sekundären Amins dar, denn sie hat außer der Aminofunktion keine polare Gruppe. FEN verfügt über einen Aromaten und einen Norbornan-Körper [bicyclo(2,2,1)heptan]. Die Größe der letztgenannten hydrophoben Struktur läßt starke Wechselwirkungen mit γ-CD erwarten.

Es sind bisher weder CD-Komplexe noch ein N-Nitrosoderivat des FEN beschrieben worden.

2.10.1. Löslichkeit des ß-Cyclodextrins in Anwesenheit von Fencamfamin

Mit α-, ß- und γ-CD wurden Versuche zur Darstellung einer festen Einschlußverbindung des FEN unternommen. Eine Ausfällung war jedoch in keinem Fall feststellbar. Statt dessen wurde eine andere interessante Beobachtung gemacht. In Anwesenheit von FEN kristallisierte nicht einmal ß-CD aus der normalerweise stark übersättigten 4prozentigen wässrigen Lösung aus. Die genaue Untersuchung dieses Effekts ergab, daß sich die Wasserlöslichkeit des ß-CD in äquimolarer Mischung mit FEN bei Raumtemperatur auf das 25-fache erhöht. Dies ist nur mit der Bildung eines stabilen FEN-ß-CD-Einschlußkomplexes

erklärlich. Es ist zu vermuten, daß der solubilisierende Effekt von der außerhalb des Hohlraums befindlichen Aminogruppe ausgeht.

Entsprechende Versuche mit α- und γ-CD wurden nicht durchgeführt, da diese Substanzen schon allein gut löslich sind.

2.10.2. NMR-Untersuchungen

Zur Beurteilung der Komplexbildung zwischen FEN und den vier CD in wässriger Lösung wurden wieder äquimolare, in D_2O gelöste Mischungen beider Komponenten mittels ^{1}H-NMR untersucht. Der Einfluß des FEN auf die Protonenresonanzspektren von α-, ß-, γ-CD und DIMEB ist den Tabellen 18 bis 21 zu entnehmen.

Tabelle 18: Einfluß von Fencamfamin (FEN) auf das Protonenresonanzspektrum von α-Cyclodextrin (α-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	α-CD ppm	FEN + α-CD ppm	Differenz ppm
H-1	4,9961	4,9899	-0,0062
H-2	3,5777	3,5670	-0,0107
H-3	3,9554	3,9370	-0,0184
H-4	3,5089	3,4960	-0,0129
H-5	3,7841	3,7823	-0,0018
H-6	3,8602	3,8442	-0,0160

Tabelle 19: Einfluß von Fencamfamin (FEN) auf das Protonenresonanzspektrum von ß-Cyclodextrin (ß-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	ß-CD ppm	FEN + ß-CD ppm	Differenz ppm
H-1	4,9551	4,9510	-0,0041
H-2	3,5344	3,5289	-0,0055
H-3	3,8423	3,7504	-0,0919
H-4	3,4594	3,4609	0,0015
H-5	3,7176	3,5683	-0,1493
H-6	3,7580	3,6340	-0,1240

Tabelle 20: Einfluß von Fencamfamin (FEN) auf das Protonenresonanzspektrum von γ-Cyclodextrin (γ-CD), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	γ-CD ppm	FEN + γ-CD ppm	Differenz ppm
H-1	5,1238	5,1966	0,0728
H-2	3,6682	3,7403	0,0721
H-3	3,9394	3,9713	0,0319
H-4	3,5950	3,6762	0,0812
H-5	3,8365	3,7796	-0,0569
H-6	3,8770	3,8390	-0,0380

Tabelle 21: Einfluß von Fencamfamin (FEN) auf das Protonenresonanzspektrum von Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin (DIMEB), aufgenommen in D_2O bei 250 MHz

CD-Proton	DIMEB ppm	FEN + DIMEB ppm	Differenz ppm
H-1	5,1743	5,1939	0,0196
H-2	3,5828	3,6109	0,0281
Me-2	3,5232	3,5591	0,0359
H-3	3,9152	3,7537	-0,1615
H-4	3,4442	3,4805	0,0363
H-5	3,6960	3,5855	-0,1105
H-6	3,7925	3,6897	-0,1028
Me-6	3,3393	3,3777	0,0384

FEN + α-CD: Herausragende Verschiebungen der inneren CD-Protonen (H-3, H-5 und H-6) sind nicht feststellbar. Demnach bilden FEN und α-CD in Lösung keinen Einschlußkomplex.

FEN + ß-CD: Die starken Verschiebungen der drei inneren CD-Protonen können nur aus einem sehr stabilen Einschluß resultieren.

FEN + γ-CD: Nur H-5 und H-6 erfahren Verschiebungen ins höhere Feld. Der Einfluß des FEN ist erst im Vergleich zu den äußeren Protonen feststellbar. So dürfte ein Einschluß vorliegen, an dem hauptsächlich die b-seitige Hohlraumhälfte des γ-CD beteiligt ist.

FEN + DIMEB: H-5, H-6 und besonders H-3 zeigen in Anwesenheit

von FEN starke Verschiebungen ins höhere Feld. Offenbar handelt es sich um einen Einschlußkomplex von besonders hoher Stabilität.

2.10.3. Einfluß von α-, ß-, γ- und Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin auf die Nitrosierung von Fencamfamin

In Abwesenheit von CD verhält sich FEN gegenüber Nitrit ausgesprochen reaktionsträge. Erst nach 60 min ist eine schwache Umsetzung zum N-Nitrosoprodukt feststellbar (Abb. 29). Maximale Absorptionswerte werden nach etwa 150 min erreicht. Kurz darauf wird die Nitrosierung von einer schnelleren Zerfallsreaktion überlagert.

Der Zusatz von α-CD bewirkt die vollständige Hemmung der Reaktion.

Die drei anderen CD steigern die Nitrosierungsrate des FEN beträchtlich. ß-CD zeigt dabei den schwächsten Effekt.

In den Ansätzen mit γ-CD kam es regelmäßig zur Bildung eines Niederschlags, der auch in starker wässriger Verdünnung bestehen blieb. Daher wurden in diesem Fall entsprechende methanolisch-wässrige (2:3) Photometrierlösungen verwendet.

In Abb. 30 ist der in Anwesenheit von γ-CD resultierende Reaktionsverlauf dargestellt. Da die Vergleichskurven ohne CD-Zusatz in beiden Abbildungen im wesentlichen übereinstimmen, kann der Einfluß des γ-CD direkt mit den Effekten der drei anderen CD verglichen werden. Dabei zeigt sich, daß die reaktionsbeschleunigende Wirkung des γ-CD nur geringfügig schwächer

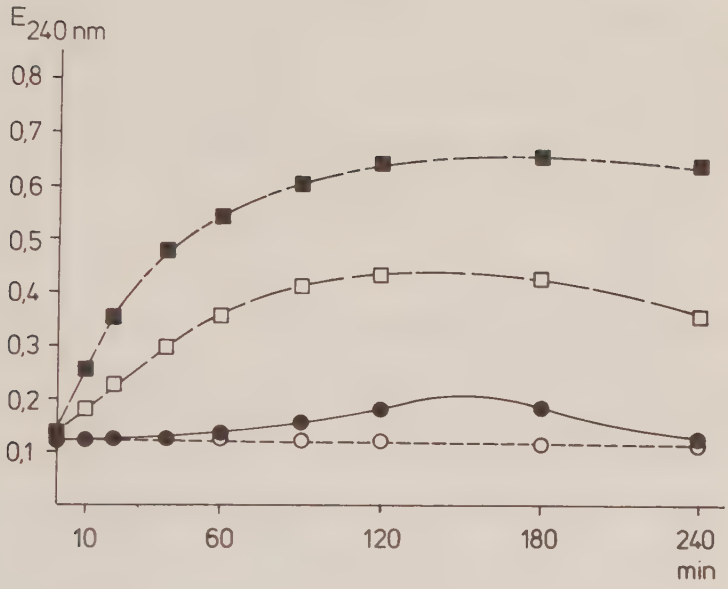


Abb. 29: In vitro-Nitrosierung von Fencamfamin in Anwesenheit von Cyclodextrinen

●———● ohne Cyclodextrin

○--------○ mit α-Cyclodextrin

□— —— —□ mit ß-Cyclodextrin

■— - —— - ■ mit Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin

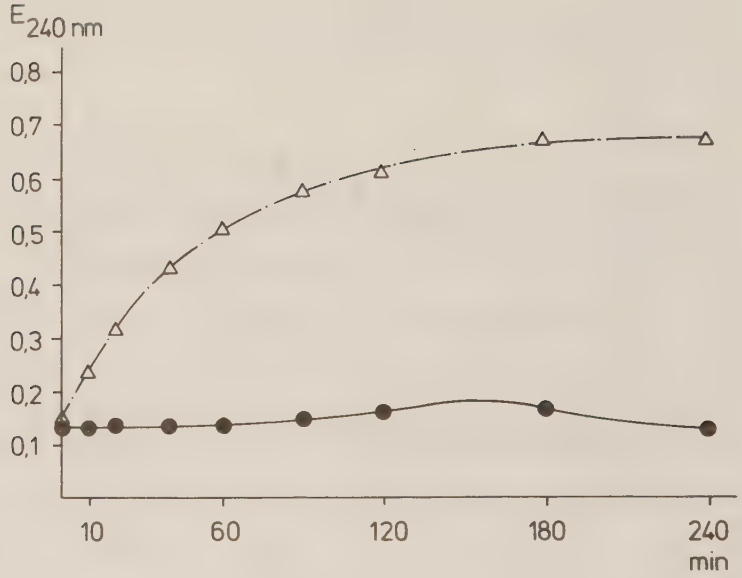


Abb. 30: In vitro-Nitrosierung von Fencamfamin in Anwesenheit von γ-Cyclodextrin

●——● ohne Cyclodextrin

△—·——·—△ mit γ-Cyclodextrin

als die des DIMEB ist. Offenbar besteht zwischen dem starken katalytischen Effekt des γ-CD und der Bildung des genannten Niederschlags ein unmittelbarer Zusammenhang. Vermutlich liegt wieder eine Nitrosamin-CD-Einschlußverbindung vor. Damit käme erneut zum Ausdruck, daß der Komplexbildung zwischen Nitrosamin und CD eine besondere Rolle beim Zustandekommen der beobachteten Effekte zukommt.

Die Beschleunigung der Nitrosierung des FEN durch ß- und γ-CD (n=6) sowie durch DIMEB (n=5) war zu jeder Probenahmezeit hochsignifikant ($P < 0{,}001$). Die Reaktionsansätze mit α-CD und ohne CD-Zusatz lieferten nur nach 90, 120 und 180 min hochsignifikant verschiedene Absorptionsmeßwerte (n=6, $P < 0{,}001$). Während zwischen γ-CD und DIMEB kein signifikanter ($P > 0{,}05$) Unterschied im katalytischen Effekt bestand, beschleunigte ß-CD die Reaktion hochsignifikant ($P < 0{,}001$) schwächer als γ-CD und DIMEB.

2.10.4. NMR-Untersuchung des N-Nitrosofencamfamin-γ-Cyclodextrin-Addukts

Ein normaler Reaktionsansatz zur Nitrosierung von FEN in Anwesenheit von γ-CD lieferte nach 180 min eine für die ^{1}H-NMR-Untersuchung ausreichende Menge von 11,2 mg des ausgefallenen Produktes. Die trockene weiße Substanz ist an der Luft beständig.

Folgende Proben wurden in Deuterodimethylsulfoxid ($DMSO-d_6$) gelöst und mittels ^1H-NMR untersucht:

A) γ-CD
B) äquimolare Mischung aus FEN und γ-CD
C) ausgefallenes Produkt

Das reine N-Nitrosoderivat des FEN ist auf Grund seiner äußerst geringen Stabilität nicht darstellbar. Daher besteht keine Vergleichsmöglichkeit mit einer physikalischen Mischung aus NFEN und γ-CD.

Das Spektrum C enthält alle Signale des Spektrums A. Damit ist γ-CD als Bestandteil des ausgefallenen Produktes identifiziert.

Außerdem finden sich im Spektrum C die Signale einer Verbindung, die dem FEN sehr ähnlich sein muß. Neben größtenteils völlig übereinstimmenden Resonanzen erscheinen einige Protonen dieser Verbindung verschoben gegenüber den entsprechenden Protonen des FEN. Demnach stellt das Spektrum C nicht FEN sondern aller Wahrscheinlichkeit nach NFEN dar. Daraus ist zu schließen, daß es sich bei dem ausgefallenen Produkt um ein NFEN-γ-CD-Addukt handelt.

Aus der Integrationskurve über eindeutigen Signalen des NFEN (Aromat) und des γ-CD (H-1) wurde das Molverhältnis zwischen NFEN und γ-CD im Addukt zu 0,95:1 ermittelt. Dieses Ergebnis spricht für das Vorliegen eines Einschlusses.

2.11. Zusammenfassende Diskussion

CD können mit geeigneten Arzneistoffmolekülen feste Einschlußverbindungen und/oder gelöste Einschlußkomplexe bilden. Während der feste Zustand meist mit der vollständigen Stabilisierung des Gastmoleküls verbunden ist, können gelöste CD die chemische Stabilität eingeschlossener Arzneistoffe in sehr unterschiedlicher Weise beeinflussen. Hydrolytische oder oxidative Reaktionen können zum Beispiel beschleunigt oder gehemmt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals untersucht, inwieweit die N-Nitrosierung von Arzneistoffen mit Aminstruktur durch CD beeinflußt wird.

Die Versuchsbedingungen wurden in Anlehnung an den NAP-Test der WHO gewählt. Dabei fand die unterschiedliche Reaktivität der verwendeten Arzneistoffe gegenüber Nitrit besondere Berücksichtigung.

Für die ersten Versuche wurde das sehr leicht nitrosierbare PIP ausgewählt. Wie mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte, bildet PIP mit ß-CD in Lösung einen Einschlußkomplex. In Anwesenheit eines PIP-Überschusses kristallisierte nach längerem Stehen das entsprechende Addukt. Die molare Zusammensetzung von 0,89:1 und die röntgendiffraktometrischen Untersuchungen lassen auf einen Einschluß des PIP im ß-CD schließen.

Die Nitrosierung des PIP verläuft in Gegenwart von α-, ß- und γ-CD ebensoschnell wie ohne CD-Zusatz. Auch das als ß-CD-Addukt eingesetzte PIP zeigte keinen Unterschied. Es ist anzu-

nehmen, daß der PIP-ß-CD-Komplex im sauren Milieu des Reaktionsmediums nicht mehr beständig ist.

Ebenfalls unbeeinflußt durch die drei CD reagieren das ETB und das Guanidinderivat CIM zu den entsprechenden N-Nitrosoverbindungen.

Ein Effekt der CD wurde erst festgestellt, als das weniger leicht nitrosierbare EPH verwendet wurde. ß-, γ-CD und DIMEB katalysieren die Nitrosaminbildung signifikant. Mittels NMR konnte nachgewiesen werden, daß EPH mit jedem dieser drei CD einen Einschlußkomplex bilden kann. In Anwesenheit von ß-CD entstand während der Reaktion ein Niederschlag, der im NMR-Spektrum als 1:1-Einschlußkomplex zwischen NEPH und ß-CD identifiziert werden konnte. α-CD hat auf die Nitrosierung des EPH einen signifikant schwach hemmenden Effekt. Ein Einschlußkomplex war in diesem Fall nicht nachweisbar.

Als N-nitrosierbar erwiesen sich auch das MEF und das FEN. In Abwesenheit von CD reagieren beide Arzneistoffe nur schwach mit Nitrit. Zusätze von ß-, γ-CD und DIMEB haben beträchtlich gesteigerte Umsatzraten zur Folge. Auch hier konnten die entsprechenden Einschlußkomplexe in Lösung nachgewiesen werden. Bei der Nitrosierung des MEF in Anwesenheit von ß- und γ-CD und des FEN mit γ-CD bildeten sich Niederschläge. NMR-spektroskopisch konnte festgestellt werden, daß es sich bei allen drei Niederschlägen um die entsprechenden Nitrosamin-CD-Addukte handelt. Die Bestimmung der molaren Zusammensetzung der Addukte ergab in etwa äquimolare Werte, was auf das Vorliegen echter Einschlußverbindungen hinweist. α-CD hat

auf die Nitrosierung des MEF keinen Einfluß, hingegen bewirkt es die vollständige Hemmung der NFEN-Synthese. Nach den Befunden der NMR-Untersuchungen kann α-CD weder mit MEF noch mit FEN einen Einschlußkomplex bilden.

Alle genannten Effekte waren signifikant. In Tabelle 22 sind sie zusammengefaßt.

Tabelle 22: Cyclodextrin-induzierte Effekte bei der Nitrosierung von l-Ephedrin, Mefenorex und Fencamfamin

o = kein Effekt
\- = schwache Hemmung
-- = vollständige Hemmung
\+ = Beschleunigung
++ = starke Beschleunigung
+++ = sehr starke Beschleunigung
↓ = Bildung einer festen Nitrosamin-CD-Einschlußverbindung

	α-CD	ß-CD	γ-CD	DIMEB
l-Ephedrin	-	++ ↓	+	+++
Mefenorex	o	++ ↓	++ ↓	+++
Fencamfamin	--	+	+++↓	+++

Aus der Korrelation der Reaktionsbeschleunigung mit der Existenz entsprechender Arzneistoff-CD-Komplexe einerseits und der gleichzeitigen Bildung einiger fester Nitrosamin-CD-Einschlußverbindungen andererseits ist zu schließen, daß die

festgestellten Effekte auf Komplexbildungsvorgänge zurückzuführen sind. Eine besondere Bedeutung wird hierbei die Bildung der Nitrosamin-CD-Komplexe haben. Die Ergebnisse der NMR-Untersuchung des NEPH-ß-CD-Systems bestätigen diese Vermutung. Das Nitrosamin NEPH bildet in wässriger Lösung mit ß-CD einen Einschlußkomplex. Es ist anzunehmen, daß derselbe Vorgang auch im Reaktionsmedium möglich ist und daß sich die beiden anderen Nitrosamine NMEF und NFEN ähnlich wie NEPH verhalten.

Die eigentliche Ursache der Reaktionsbeschleunigungen sollte jedoch in der höheren Stabilität der Nitrosamin-CD-Komplexe gegenüber den entsprechenden Amin-CD-Komplexen liegen. Aus der N-Nitrosierung eines sekundären Amins geht immer ein hydrophoberes Molekül, das Nitrosamin, hervor. Wenn also das Amin schon ein geeignetes Gastmolekül für einen CD-Einschluß ist, dann sind die hydrophoben Bindungskräfte zwischen dem Nitrosamin und dem CD eher noch stärker. Ein Vergleich der Ergebnisse der Systeme EPH-ß-CD und NEPH-ß-CD unterstützt diese Schlußfolgerung. Auf indirektem Wege konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie festgestellt werden, daß der Nitrosamin-CD-Komplex tatsächlich etwas stabiler ist als der entsprechende Amin-CD-Komplex.

Die hohe Reaktivität der drei aromatischen Arzneistoffe EPH, MEF und FEN zeigt aber auch, daß sich die nitrosierbaren Aminogruppen nicht im Hohlraum der CD befinden. Vermutlich ist zur Nitrosierung nicht einmal die Dissoziation des Amin-CD-Komplexes erforderlich. Vielmehr sollte die Reaktion am

intakten Komplex ablaufen können. Eine feste Nitrosamin-CD-Einschlußverbindung wird jedoch nur dann erhalten, wenn der Nitrosamin-CD-Komplex relativ schlecht löslich ist. So ist zu erklären, weshalb DIMEB trotz seines sehr starken katalytischen Effekts mit keinem der drei Nitrosamine eine feste Einschlußverbindung bildete. Die extreme Löslichkeitkeit des DIMEB gilt auch für dessen Komplexe.

Einer gesonderten Interpretation bedarf der signifikante Hemmeffekt des α-CD auf die Nitrosierung von EPH und FEN. Da die entsprechenden Arzneistoff-α-CD-Komplexe nicht nachweisbar waren, muß hier ein anderer Mechanismus vorliegen. Denkbar wäre der Einschluß undissoziierter Salpetriger Säure oder des nitrosierenden Agens N_2O_3 im Hohlraum des α-CD. Dadurch würde das eingesetzte Nitrit abgefangen und der Reaktion entzogen werden. Wie CRAMER und HENGLEIN (138) an zahlreichen Gasen demonstrieren konnten, besteht durchaus die Möglichkeit, daß derartig kleine Moleküle mit α-CD einen Einschlußkomplex bilden.

Die vorliegende Arbeit deckt eine bisher nicht erkannte unerwünschte Wechselwirkung zwischen N-nitrosierbaren Arzneistoffen und CD auf. Diese muß Berücksichtigung finden, wenn derartige Arzneistoffe zusammen mit CD verabfolgt werden sollen. Für das Risiko einer endogenen Nitrosierung im menschlichen Gastrointestinaltrakt ist es letztlich sogar belanglos, ob das CD einer gemeinsamen Formulierung mit dem nitrosierbaren Arzneistoff oder einer gleichzeitig eingenommenen Lebensmittelzubereitung entstammt.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Substanzen

3.1.1. Cyclodextrine

α-Cyclodextrin: Fa. Aldrich-Europe, Beerse, Charge 85609-6

ß-Cyclodextrin*: Fa. Chinoin, Budapest

γ-Cyclodextrin: Nihon Shokuhin Kako Co., Tokyo, Charge C 113 A 2 I

3.1.2. Arzneistoffe

Piperazin (wasserfrei, rein): Fa. Ferak, Berlin, Charge 009101 K

Ethambutoldihydrochlorid** (Aktivität 100%): Cyanamid GmbH, Wolfratshausen, Batch 211 M, Code 0673

Cimetidin**: Smith Kline & French Laboratories Ltd., Welwyn Garden City, Charge B/IR 3807

L-Ephedrinsulfat (p.a.): Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Mefenorexhydrochlorid**: Fa. Homburg, Frankfurt, Charge 182

Fencamfaminhydrochlorid**: Fa. Merck, Darmstadt, Charge 3286123

.* Herrn Prof. Szejtli (Fa. Chinoin) wird für die Überlassung der Substanz gedankt.

** Diese Substanzen wurden uns von den betreffenden Firmen zur Verfügung gestellt, wofür ebenfalls gedankt wird.

3.1.3. Sonstige Substanzen

Natriumnitrit

Fa. Ferak, Berlin, Charge 4101739 H

Die Substanz war analysenrein.

Kaliumhydroxid (p.a.)

Fa. Merck, Darmstadt

Salzsäure

Die pH-Einstellung der Arzneistoff-Stammlösungen (siehe 3.4.) erfolgte stets mit rauchender Salzsäure, 37%, reinst, Fa. Merck, Darmstadt.

Wasser

Es wurde stets destilliertes Wasser verwendet.

3.2. Physikalische und physikalisch-chemische Methoden

3.2.1. Schmelzpunktbestimmungen

Es wurde ein Mikroschmelzpunktapparat nach Kofler der Fa. Reichert, Wien, verwendet.

3.2.2. pH-Messungen

Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentrationen diente ein digitales pH-Meßgerät, Typ PW 9409, Fa. Philips, in Verbindung mit einer Einstabmeßkette, Typ 405-M 5, Fa. Ingold. Der Abgleich erfolgte mit Standardpufferlösungen bei pH 7,00 und pH 3,00.

3.2.3. Röntgenbeugungsaufnahmen

Es wurde das Guiniersystem 600 der Fa. Robert Huber Diffraktionstechnik, Rimsting, unter Anwendung von Cu-$K_{\alpha 1}$-Strahlung verwendet; Belichtungszeit 10 h; Beschleunigungsspannung 40 kV bei 25 mA. Die Aufnahmen erfolgten auf Filmen. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikrodensitometer 3CS der Fa. Joyce-Loebl, Gateshead.

3.2.4. Kernresonanzmessungen

Die ^{1}H-NMR-Spektren wurden mit einem 250-MHz-Spektrometer, Typ WM 250, Fa. Bruker, Karlsruhe, aufgenommen. Als interner Standard diente bei den in D_2O gelösten Proben 3-Trimethylsilyl-propionsäure-d_4-Natriumsalz (TSP); bei den in DMSO-d_6 gelösten Proben wurde Tetramethylsilan verwendet.

3.3. Darstellungen

3.3.1. Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-ß-Cyclodextrin

Die Synthese wurde nach den von SZEJTLI et al. (109) genannten Angaben durchgeführt:
Zu einer Lösung von 9,0 g ß-CD in 300 ml DMSO-DMF (1:1) wurde im Laufe von 20 min unter Rühren portionsweise eine Mischung von 78 g BaO und 78 g $Ba(OH)_2 \cdot 8\ H_2O$ gegeben. Die Mischung wurde auf 0°C abgekühlt und anschließend innerhalb von 2 h unter intensivem Rühren tropfenweise mit 100 ml Dimethylsulfat

versetzt. Das Rühren wurde weitere 2 d fortgesetzt. Dann wurde die Mischung für 30 min auf 85°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde der Überschuß an Dimethylsulfat durch die Zugabe von 105 ml konzentrierter wässriger Ammoniaklösung zersetzt und die Mischung für weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde sie mit 500 ml Chloroform verdünnt und filtriert. Der Niederschlag wurde mit 2×100 ml Chloroform gewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum (Rotavapor, Fa. Büchi) zu einem sirupartigen Rückstand eingeengt, der beim Stehen (3 d) kristallisierte.

Das rohe Produkt wurde in 40 ml kaltem Wasser gelöst, mit 2×1 g Aktivkohle entfärbt und filtriert. Das Filtrat wurde in einem Trockenschrank auf 85°C erhitzt. Der Niederschlag wurde auf ein erwärmtes Filter (Glasfritte, 80°C) gebracht und in Warmluft getrocknet.

Farblose Kristalle.

Ausbeute: 28,2%

Schmelzpunkt: 311°C (SZEJTLI et al. (109): 310 - 312°C)

3.3.2. N-Nitrosoephedrin

Die Verbindung wurde in Anlehnung an die Vorschrift von KINAWI und SCHUSTER (112) hergestellt:

In einem Reagenzglas wurden bei Raumtemperatur 428 mg L-Ephedrinsulfat in 1,0 ml verdünnter Salzsäure (pH 0,9) gelöst. Anschließend wurden unter Rühren 206 mg Natriumnitrit, gelöst in 0,5 ml Wasser, auf einmal zugesetzt (Molverhältnis EPH/

Nitrit: 2:3). Die sofortige Bildung von NEPH verursachte eine deutliche Trübung der Reaktionslösung, deren pH-Wert bei 4 lag. Nach etwa 10 min wurde die Lösung mit 5 µl konzentrierter Salzsäure auf pH 3 angesäuert. Nach 60 min wurde der Ansatz zweimal mit je 2,0 ml Methylenchlorid extrahiert, die vereinigten Extrakte zweimal mit je 1,0 ml verdünnter Salzsäure (pH 3) gewaschen und mit Calciumchlorid getrocknet. Dann wurde der Methylenchlorid-Extrakt auf dem Wasserbad bei 70°C weitgehend eingeengt und schließlich im Vakuum bei Raumtemperatur von den letzten Spuren des Lösungsmittels befreit.

Schwachgelbe, fast farblose kristalline Substanz.

Ausbeute: 68,7%

Schmelzpunkt: 89°C (KINAWI und SCHUSTER (112): 89,7°C)

^{1}H-NMR (D_2O): δ (ppm) = 1,1 (Doppeldublett; 1H, N-CH), 1,5 (Dublett; 3H, CH_3), 2,89 (Singulett; 3H, N-CH_3), 4,9 (Dublett; 1H, CH), 7,28 - 7,36 (Multiplett; 5H, aromat.)

3.3.3. Piperazin-ß-Cyclodextrin-Addukt

Bei 70°C wurden 0,40 g PIP und 1,00 g ß-CD zu 100,0 ml Wasser gelöst. Nach 10tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank wurde die ausgefallene Verbindung scharf abgesaugt und zweimal mit je 10,0 ml eisgekühltem Wasser gewaschen.

Farblose, geruchlose Kristallnadeln.

Ausbeute: 0,49 g Addukt

Gehaltsbestimmung:

In jeweils 30,0 ml Wasser wurden gelöst:

A) 0,4253 g Addukt (n=3)
B) 0,4253 g äquimolare Mischung aus PIP und ß-CD (n=3)
C) 0,0300 g PIP (n=3)
D1) 0,0100 g, D2) 0,0200 g und D3) 0,0250 g PIP (alle n=1)

Die Titration der Lösungen erfolgte unter kontinuierlicher Potentialmessung (Gerät: siehe 3.2.2.) mit 0,05 N Salzsäure (Titrisol, Fa. Merck). Der Äquivalenzpunkt wurde nach der Wendepunktsmethode (139) ermittelt. Die bis dahin verbrauchten Volumina der Maßlösung sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefaßt.

	Addukt	Mischung	PIP
ml 0,05 N HCl	5,28	5,82	6,70
"	5,58	6,26	6,58
"	5,56	6,34	6,55
Mittelwert	5,48	6,14	6,61

	D1	D2	D3
ml 0,05 N HCl	2,12	4,30	5,28

Der Titrationsverlauf einer Blindprobe mit 0,3953 g ß-CD zeigte keinen Wendepunkt.

Die Werte von D1, D2, D3 und PIP lassen ein nahezu lineares Verhältnis zwischen der PIP-Einwaage und dem Verbrauch erkennen.

Ein Vergleich der Werte des Addukts, der Mischung und des reinen PIP zeigt, daß der PIP-Anteil im Addukt geringer als äquimolar ist. Bezogen auf den mittleren Verbrauch der 0,0300 g PIP enthaltenden Mischung entspricht der mittlere Verbrauch des Addukts einer Menge von 0,0268 g PIP. Das Molverhältnis zwischen PIP und ß-CD im Addukt beträgt dann 0,89:1.

3.4. Stammlösungen für die Nitrosierungen

A)	Piperazin	0,9475 g	
	Salzsäure, 37%	3,0 ml	
	Wasser	zu 1000,0 ml	(pH 1,95)
B)	Piperazin	0,9475 g	
	Salzsäure, 37%	2,6 ml	
	Wasser	zu 1000,0 ml	(pH 4,80)
C)	Ethambutoldihydrochlorid	3,0492 g	
	Salzsäure, 37%	1,0 ml	
	Wasser	zu 1000,0 ml	(pH 2,03)
D)	L-Ephedrinsulfat	4,7135 g	
	Salzsäure, 37%	1,0 ml	
	Wasser	zu 1000,0 ml	(pH 2,03)
E)	Mefenorexhydrochlorid	2,7301 g	
	Salzsäure, 37%	0,5 ml	
	Wasser	zu 500,0 ml	(pH 2,00)
F)	Fencamfaminhydrochlorid	2,7697 g	
	Salzsäure, 37%	0,5 ml	
	Wasser	zu 500,0 ml	(pH 1,97)

G)	Natriumnitrit	3,0360 g
	Wasser	zu 100,0 ml
H)	Cimetidin	1,5144 g
	Wasser	zu 1000,0 ml (pH 8,63)
I)	Natriumnitrit	1,6560 g
	Wasser	zu 100,0 ml

3.5. Durchführung und Analytik der Nitrosierungen

3.5.1. Piperazin, Ethambutol, l-Ephedrin, Mefenorex und Fencamfamin

2,0 ml Arzneistoff-Stammlösung (A, B, C, D, E bzw. F) wurden in ein verschraubbares 4,5-ml-Kunststoff-Reagenzröhrchen überführt und auf 37°C temperiert. Bei den Versuchen mit CD enthielt diese Lösung zusätzlich 42,8 mg α-CD, 50,0 mg ß-CD, 57,1 mg γ-CD bzw. 58,6 mg DIMEB.

Die Reaktion wurde durch einmalige Zugabe von 200 µl Natriumnitrit-Stammlösung G von 37°C mit anschließendem kräftigen Schütteln des Reagenzröhrchens mit der vorgelegten Lösung gestartet. Unmittelbar darauf, nach 0,5 min, erfolgte die erste Probenziehung. Hierzu wurden 200 µl der Reaktionslösung entnommen, in ein 25-ml-Meßkölbchen, in dem sich 10 ml verdünnte Kalilauge bzw. 10 ml reines Wasser (siehe Tab. 23) befanden, gegeben und durch sofortiges mehrfaches Umschwenken darin verteilt. Die weiteren Probenahmezeiten wurden in Abhängigkeit von der Reaktivität des betreffenden Arzneistoffs festgelegt (Tab. 23).

Tabelle 23: Entnahmezeiten und Neutralisationsmedien der Nitrosamin-Proben

	Probenahmezeiten (min)	Neutralisation in 10 ml
Piperazin (pH 3)	1,2,4,6,8,10,20	0,04% KOH
Piperazin (pH 5)	15,30,45,60,75,90,105,120	Wasser
Ethambutol	1,2,4,6,8,10,20,40,60	0,04% KOH
l-Ephedrin	10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240	0,04% KOH
Mefenorex		Wasser
Fencamfamin		0,006% KOH*

* Bei den Versuchen mit γ-CD wurde eine methanolische Lösung verwendet.

Nach dem Auffüllen mit Wasser bis zur Marke erfolgte die spektralphotometrische Bestimmung der gebildeten N-Nitrosoverbindung im Absorptionsmaximum bei 240 nm.

Gerät: PMQ 3, Fa. Zeiss, Oberkochen

Schichtdicke: 1 cm

Vergleichsmedium: Wasser

3.5.2. Cimetidin

In eine auf 37°C temperierte 1-cm-Küvette wurden 2,0 ml CIM-Stammlösung (H) und 200 µl Natriumnitrit-Stammlösung I gegeben und miteinander vermischt. Zur Vorbereitung der CD-haltigen Reaktionslösungen waren die folgenden Mengen bereits in die leeren Küvetten eingewogen worden: 11,7 mg α-CD, 13,6 mg ß-CD bzw. 15,6 mg γ-CD. In diesem Stadium war der Reaktionsansatz noch völlig inaktiv; eine Absorptionszunahme war während 20 min nicht feststellbar.

Die Nitrosierung wurde gestartet, indem 200 µl 1 N Salzsäure auf einmal zugesetzt und durch mehrmaliges rasches Ansaugen und Entleeren der verwendeten Pipette mit der vorgelegten Lösung gut vermischt wurden. Der Reaktionsverlauf wurde unter kontinuierlicher Messung der Absorption bei 305 nm gegen Wasser während 140 min verfolgt.

Zur methodischen Überprüfung wurden folgende Gegenproben durchgeführt:

1. 2,0 ml CIM-Stammlösung + 200 µl 1 N Salzsäure
   + 200 µl Wasser
2. 2,0 ml Wasser + 200 µl Natriumnitrit-Stammlösung I
   + 200 µl 1 N Salzsäure

In beiden Fällen blieben die angezeigten Extinktionen während 20 min konstant. Damit war ausgeschlossen, daß es sich bei den festgestellten Reaktionen um Zersetzungen handelt.

Gerät: siehe 3.5.1.

3.6. Statistische Prüfungen

Sämtliche Meßreihen der Versuche mit EPH, MEF und FEN wurden mittels Varianzanalyse auf Signifikanz geprüft (140). Auf hochsignifikante Unterschiede zwischen zwei Meßreihen ist geschlossen worden, wenn die errechnete Prüfgröße t größer als der bei P = 0,001 tabellierte Wert war.

4. LITERATURVERZEICHNIS

1. FREUDENBERG, K., MEYER-DELIUS, M.,
   Ber. Dtsch. Chem. Ges. 71, 1596 (1938)

2. CRAMER, F.,
   Angew. Chem. 64, 437 (1952)

3. RAO, V.S.R., FOSTER, J.F.,
   J. Phys. Chem. 67, 951 (1963)

4. HARATA, K., KAWANO, K., FUKUNAGA, K., OHTANI, Y.,
   Chem. Pharm. Bull. 31, 1428 (1983)

5. FRENCH, D., LEVINE, M.L., PAZUR, J.H., NORBERG, E.,
   J. Am. Chem. Soc. 71, 353 (1949)

6. SCHLENK jr., W.,
   Organische Einschlußverbindungen, in: Fischer, F.G., Kohlschütter, H.W., Schäfer, K., Fortschritte der chemischen Forschung, Bd. 2, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951/53, S. 92

7. SCHLENK jr., W.,
   Chemie in unserer Zeit 3, 121 (1969)

8. CRAMER, F.,
   Einschlußverbindungen, Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954

9. CRAMER, F.,
   Angew. Chem. 68, 115 (1956)

10. VAN ETTEN, R.L., SEBASTIAN, J.F., CLOWES, G.A., BENDER, M.L.,
    J. Am. Chem. Soc. 89, 3242 (1967)

11. BERGERON, R.J., ALMY CHANNING, M., GIBEILY, G.J., PILLOR, D.M.,
    J. Am. Chem. Soc. 99, 5146 (1977)

12. KOMIYAMA, M, BENDER, M.L.,
    J. Am. Chem. Soc. 100, 2259 (1978)

13. UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M., OTAGIRI, Y., IKEDA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 26, 1162 (1978)

14. COHEN, J., LACH, J.L.,
J. Pharm. Sci. 52, 132 (1963)

15. CRAMER, F., Kampe, W.,
J. Am. Chem Soc. 87, 1115 (1965)

16. OTAGIRI, M., UEKAMA, K., IKEDA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 23, 188 (1975)

17. McMULLAN, R.K., SAENGER, W., FAYOS, J., MOOTZ, D.,
Carbohydr. Res. 31, 37 (1973)

18. CRAMER, F., HENGLEIN, F.M.,
Chem. Ber. 90, 2561 (1957)

19. SAENGER, W.,
Angew. Chem. 92, 343 (1980)

20. SZEJTLI, J.,
Cyclodextrins and their Inclusion Complexes,
Akadémiai Kiadó, Budapest 1982, S. 236 ff.

21. SZEJTLI, J., SEBESTYÉN, G.,
Stärke 31, 385 (1979)

22. SZEJTLI, J., GERLÓCZY, A., FÓNAGY, A.,
Arzneim.-Forsch. 30, 808 (1980)

23. FRANK, D.W., GRAY, J.E., WEAVER, R.N.,
Am. J. Pathol. 83, 367 (1976)

24. FRÖMMING, K.-H.,
Pharmazie in unserer Zeit 2, 109 (1973)

25. FRÖMMING, K.-H.,
Proceedings of the I. Int. Symp. on Cyclodextrins 1981,
Akadémiai Kiadó, Budapest 1982, S. 367

26. SZEJTLI, J.,
Stärke 29, 26 (1977)

27. wie 20., S. 204 ff.

28. UEKAMA, K.,
Yakugaku Zasshi (J. Pharm. Soc. Jap.) 101, 857 (1981)

29. JONES, S.P., GRANT, D.J.W., HADGRAFT, J., PARR, G.D.,
Acta Pharm. Technol. 30, 213 u. 263 (1984)

30. LACH, J.L., CHIN, T.-F.,
J. Pharm. Sci. 53, 924 (1964)

31. KOIZUMI, K., TATSUMI, J., OHAE, M., KUMAGAI, H.,
HAYATA, T.,
Yakugaku Zasshi (J. Pharm. Soc. Jap.) 89, 1594 (1969)

32. UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., WAKUDA, T., OTAGIRI, M.,
Chem. Pharm. Bull. 29, 213 (1981)

33. UEKAMA, K., FUJINAGA, T., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M.,
KURONO, Y., IKEDA, K.,
J. Pharm. Pharmacol. 34, 627 (1982)

34. FUJIOKA, K., KUROSAKI, Y., SATO, S., NOGUCHI, Tetsuo,
NOGUCHI, Takeshi, YAMAHIRA, Y.,
Chem. Pharm. Bull. 31, 2416 (1983)

35. ANDERSEN, F.M., BUNDGAARD, H.,
Int. J. Pharm. 19, 189 (1984)

36. FRÖMMING, K.-H., SANDMANN, R., WEYERMANN, I.,
Dtsch. Apoth. Ztg. 112, 707 (1972)

37. SZEJTLI, J., BÁNKY-ELÖD, E.,
Stärke 27, 368 (1975)

38. SZEJTLI, J., BOLLA-PUSZTAI, É., SZABÓ, P., FERENCZY, T.,
Pharmazie 35, 779 (1980)

39. UEKAMA, K., NARISAWA, S., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M.,
KAWANO, K., OHTANI, T., OGINO, H.,
Int. J. Pharm. 13, 253 (1983)

40. UEKAMA, K., OH, K., OTAGIRI, M., SEO, H., TSURUOKA, M.,
Pharm. Acta Helv. 58, 338 (1983)

41. UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., YAMADA, Y., INABA, K., IKEDA, K.,
J. Pharm. Sci. 68, 1059 (1979)

42. UEKAMA, K., FUJISE, A., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M., INABA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 32, 275 (1984)

43. HIRAYAMA, F., KURIHARA, M., UEKAMA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 32, 4237 (1984)

44. FRÖMMING, K.-H., WEYERMANN, I.,
Arch. Pharm. 305, 290 (1972)

45. SZEJTLI, J., SZENTE, L.,
Pharmazie 36, 694 (1981)

46. UEKAMA, K., FUJINAGA, T., HIRAJAMA, F., OTAGIRI, M., YAMASAKI, M.,
Int. J. Pharm. 10, 1 (1982)

47. SEO, H., TSURUOKA, M., HASHIMOTO, T., FUJINAGA, T., OTAGIRI, M., UEKAMA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 31, 286 (1983)

48. UEKAMA, K., NARISAWA, S., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M.,
Int. J. Pharm. 16, 327 (1983)

49. KRÁLOVÁ, K., MITTERHAUSZEROVÁ, L., STADLER-SZÖKE, A.,
Pharmazie 38, 547 (1983)

50. UEKAMA, K., FUJINAGA, T., HIRAYAMA, F., OTAGIRI, M., YAMASAKI, M., SEO, H., HASHIMOTO, T., TSURUOKA, M.,
J. Pharm. Sci. 72, 1338 (1983)

51. TOKUMURA, T., UEDA, H., TSUSHIMA, Y., KASAI, M., KAYANO, M., AMADA, I., NAGAI, T.,
Chem. Pharm. Bull. 32, 4179 (1984)

52. UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., FUJISE, A., OTAGIRI, M., INABA, K., SAITO, H.,
J. Pharm. Sci. 73, 382 (1984)

53. FRÖMMING, K.-H., WEYERMANN, I.,
Arzneim.-Forsch. 23, 424 (1973)

54. ANSCHÜTZ, J.,
Dissertation, Freie Universität Berlin (1985)

55. NAMBU, N., SHIMODA, M., TAKAHASHI, Y., UEDA, H.,
NAGAI, T.,
Chem. Pharm. Bull. 26, 2952 (1978)

56. IWAOKU, R., ARIMORI, K., NAKANO, M., UEKAMA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 30, 1416 (1982)

57. SZEJTLI, J., GERLÓCZY, A., FÓNAGY, A.,
Pharmazie 38, 100 (1983)

58. ANDERSEN, F.M., BUNDGAARD, H., MENGEL, H.B.,
Int. J. Pharm. 21, 51 (1984)

59. UEKAMA, K., IRIE, T., SUNADA, M., OTAGIRI, M.,
IWASAKI, K., OKANO, Y., MIYATA, T., KASE, Y.,
J. Pharm. Pharmacol. 33, 707 (1981)

60. NAMBU, N., KIKUCHI, K., KIKUCHI, T., TAKAHASHI, Y.,
UEDA, H., NAGAI, T.,
Chem. Pharm. Bull. 26, 3609 (1978)

61. SZEJTLI, J., GERLÓCZY, A., SEBESTYÉN, G., FÓNAGY, A.,
Pharmazie 36, 283 (1981)

62. CRAMER, F., DIETSCHE, W.,
Chem. Ber. 92, 1739 (1959)

63. DIEDERICH, F.,
Chemie in unserer Zeit 17, 105 (1983)

64. SIRLIN, C.,
Bull. Soc. Chim. France 1-2, II-5 (1984)

65. BENDER, M.L., KOMIYAMA, M.,
Cyclodextrin Chemistry, Springer-Verlag Berlin-
Heidelberg-New York 1978, S. 34 ff.

66. CRAMER, F.,
Chem. Ber. 86, 1576 (1953)

67. VAN ETTEN, R.L., CLOWES, G.A., SEBASTIAN, J.F., BENDER, M.L., J. Am. Chem. Soc. 89, 3253 (1967)

68. KOMIYAMA, M., BENDER, M.L., J. Am. Chem. Soc. 99, 8021 (1977)

69. HENNRICH, N., CRAMER, F., J. Am. Chem. Soc. 87, 1121 (1965)

70. IWAKURA, Y., UNO, K., TODA, F., ONOZUKA, S., HATTORI, K., BENDER, M.L., J. Am. Chem. Soc. 97, 4432 (1975)

71. KOMIYAMA, M., HIRAI, H., J. Am. Chem. Soc. 105, 2018 (1983)

72. KOMIYAMA, M., HIRAI, H., J. Am. Chem. Soc. 106, 174 (1984)

73. EISENBRAND, G., 41. FIP-Kongreß, Wien 1981, Dtsch. Apoth. Ztg. 121, 2150 (1981)

74. BARNES, J.M., MAGEE, P.N., Brit. J. Industr. Med. 11, 167 (1954)

75. MAGEE, P.N., BARNES, J.M., Brit. J. Cancer 10, 114 (1956)

76. SCHMÄHL, D., PREUSSMANN, R., HAMPERL, H., Naturwissenschaften 47, 89 (1960)

77. DRUCKREY, H., SCHMÄHL, D., Naturwissenschaften 49, 217 (1962)

78. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., SCHMÄHL, D., MÜLLER, M., Naturwissenschaften 48, 165 (1961)

79. DRUCKREY, H., PREUSSMANN, R., IVANKOVIC, S., SCHMÄHL, D., Z. Krebsforsch. 69, 103 (1967)

80. WALTERS, C.L., SMITH, P.L.R., REED, P.I., HAINES, K., HOUSE, F.R.,
IARC Sci. Publ. 41, 345 (1982)

81. SUGIMURA, T., FUJIMURA, S.,
Nature 216, 943 (1967)

82. POOL, B.L., EISENBRAND, G., SCHMÄHL, D.,
Toxicology 15, 69 (1979)

83. SCHWARZ, M., HUMMEL, J., EISENBRAND, G.,
Cancer Letters 10, 223 (1980);
cit. in 84., S. 301

84. EISENBRAND, G., SCHMÄHL, D.
in: Breimer, D.D., Speiser, P., Topics in Pharmaceutical Sciences, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981, S. 291

85. SCHMÄHL, D., HABS, M.,
Oncology 37, 237 (1980)

86. MIRVISH, S.S.,
Toxicol. Appl. Pharmacol. 31, 325 (1975)

87. EISENBRAND, G.,
N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
Stuttgart 1981, S. 14, S. 18 ff.

88. LAMBRECHT, G.,
Pharmazie heute (Beilage Dtsch. Apoth. Ztg.)
3 (96), 85 (1981);
Med. Mo. Pharm. 5, 212 (1982)

89. SMITH, P.A.S., LOEPPKY, R.N.,
J. Am. Chem. Soc. 89, 1147 (1967)

90. OKUN, J.D., ARCHER, M.C.,
IARC Sci. Publ. 14, 147 (1976)

91. MIRVISH, S.S., WALLCAVE, L., EAGEN, M., SHUBIK, P.,
Science 177, 65 (1972)

92. DAHN, H., LOEWE, L., BUNTON, C.A.,
Helv. Chim. Acta 43, 320 (1960)

93. MERGENS, W.J., KAMM, J.J., NEWMARK, H.L. FIDDLER, W.,
PENSABENE, J.,
IARC Sci. Publ. 19, 199 (1978)

94. LIJINSKY, W., CONRAD, E., VAN DE BOGART, R.,
Nature 239, 165 (1972)

95. SCHMIDT, R.F., THEWS, G. (Hrsg.),
Physiologie des Menschen, 19. Auflage, Springer-Verlag
Berlin-Heidelberg-New York 1977, S. 587 f.

96. DRUCKREY, H., STEINHOFF, D., BEUTHNER, H., SCHNEIDER, H.,
KLÄRNER, P.,
Arzneim.-Forsch. 13, 320 (1963)

97. SANDER, J., SCHWEINSBERG, F., MENZ, H.-P.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1691 (1968)

98. GREENBLATT, M., MIRVISH, S.S.,
J. Natl. Cancer Inst. 50, 119 (1973)

99. BIANCIFIORI, C., MONTESANO, R., BOLIS, G.B.,
Se. Lav. Ist. Anat. Istol. Patol. Perugia 35, 45 (1975);
cit. in 87., S. 95

100. SCHNEIDER, J., WARZOK, R., SCHWARZ, H.,
Exp. Pathol. 13, 32 (1977)

101. RAO, G.S., ADATIA, M.R.,
Pharmacologist 22, 222 (1980)

102. RUDDELL, W.S.J., BONE, E.S., HILL, M.J., BLENDIS, L.M.,
WALTERS, C.L.,
Lancet II, 1037 (1976)

103. FORSTER, A. u. Mitarb.,
Nouv. Presse Méd. 11, 2281 (1982);
ref. in: Dtsch. Apoth. Ztg. 123, 1492 (1983)

104. ROTH, H.J.,
Apotheken-Journal, H. 1, 14 (1981)

105. BELLANDER, B.T.D., HAGMAR, L.E., ÖSTERDAHL, B.-G.,
Lancet II, 372 (1981)

106. COULSTON, F., DUNNE, J.F. (Hrsg.),
The Potential Carcinogenicity of Nitrosatable Drugs,
WHO Symposium, Genf, Juni 1978,
Ablex Publ. Corp. Norwood, New Jersey 1980, S. 1 ff.

107. EISENBRAND, G.
in: Preussmann, R., Das Nitrosamin-Problem,
Deutsche Forschungsgemeinschaft,
Verlag Chemie, Weinheim 1983, S. 213 ff.

108. BERSCHEID, H.G., FEHLHABER, H.W., GERICKE, D., KIEF, H.,
SCHUTZ, E., KRAMER, M.
in 106., S. 121 ff.

109. SZEJTLI, J., LIPTÁK, A., JODÁL, I., FÜGEDI, P.,
NÁNÁSI, P., NESZMÉLYI, A.,
Stärke 32, 165 (1980)

110. ZIEBARTH, D.,
Arch. Geschwulstforsch. 51, 587 (1981)

111. MONTESANO, R., BARTSCH, H., BRÉSIL, H.,
J. Natl. Cancer Inst. 52, 907 (1974)

112. KINAWI, A., SCHUSTER, T.,
Arzneim.-Forsch. 28, 219 (1978)

113. DEMARCO, P.V., THAKKAR, A.L.,
Chem. Commun. 2 (1970)

114. IKEDA, K., UEKAMA, K., OTAGIRI, M.,
Chem. Pharm. Bull. 23, 201 (1975)

115. UEDA, H., NAGAI, T.,
Chem. Pharm. Bull. 28, 1415 (1980)

116. NAKAJIMA, T., SUNAGAWA, M., HIROHASHI, T., FUJIOKA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 32, 383 (1984)

117. NAKAI, Y., YAMAMOTO, K., TERADA, K., AKIMOTO, K.,
Chem. Pharm. Bull. 32, 685 (1984)

118. UEKAMA, K., OTAGIRI, M., KANIE, Y., TANAKA, S., IKEDA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 23, 1421 (1975)

119. RÜCKER, G.,
Spektroskopische Methoden in der Pharmazie, Bd. II,
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
Stuttgart 1976, S. 10, S. 30

120. FRANK, S.G., KAVALIUNAS, D.R.,
J. Pharm. Sci. 72, 1215 (1983)

121. THAKKAR, A.L., DEMARCO, P.V.,
J. Pharm. Sci. 60, 652 (1971)

122. HIGUCHI, T., LACH, J.L.,
J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. 43, 349 (1954)

123. OTAGIRI, M., MIYAJI, T., UEKAMA, K., IKEDA, K.,
Chem. Pharm. Bull. 24, 1146 (1976)

124. FRANK, S.G., CHO, M.J.,
J. Pharm. Sci. 67, 1665 (1978)

125. wie 20., S. 33

126. KINAWI, A., KIA, H.,
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 365 (1978)

127. SZEJTLI, J.,
Stärke 30, 427 (1978)

128. Cimetidine-Information for Investigators,
The Research Institute, Smith Kline & French
Laboratories Ltd., Welwyn Garden City, England 1975

129. LACH, J.L., COHEN, J.,
J. Pharm. Sci. 52, 137 (1963)

130. CROFT, A.P., BARTSCH, R.A.,
Tetrahedron 39, 1417 (1983)

131. CASU, B., REGGIANI, M., GALLO, G.G., VIGEVANI, A.,
Tetrahedron 24, 803 (1968)

132. BERGERON, R., MACHIDA, Y., BLOCH, K.,
J. Biol. Chem. 250, 1223 (1975)

133. wie 20., S. 78 f.

134. UEKAMA, K.,
Pharmacy Int. 3/85, 61 (1985)

135. SZEJTLI, J.,
Journal of Inclusion Phenomena 1, 135 (1983)

136. SZEJTLI, J., BOLLA-PUSZTAI, É., KAJTÁR, M.,
Pharmazie 37, 725 (1982)

137. PITHA, J., SZENTE, L.,
Life Sci. 32, 719 (1983)

138. CRAMER, F., HENGLEIN, F.M.,
Chem. Ber. 90, 2572 (1957)

139. JANDER, G., JAHR, K.F., KNOLL, H.,
Maßanalyse, Sammlung Göschen Bd. 8221,
de Gruyter-Verlag Berlin-New York 1973, S. 297 f.

140. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Bd. VII A,
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1971,
S. 136-145

Lebenslauf

20. April 1956	geboren in Berlin
Eltern	Kraftwerksmeister Hans-Jürgen Wedelich Lucie Wedelich, geb. Jüngel
1963 - 1969	Grundschule in Berlin-Spandau
1969 - 1975	Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau
1975, 18. Juni	Reifeprüfung
WS 1975/76	Studium der Geophysik an der Technischen Universität Berlin
SS 1976 - WS 1979/80	Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin
1978, 17. März	1. Pharmazeutische Prüfung
1980, 6. Juni	2. Pharmazeutische Prüfung
1980 - 1981	Praktisches Jahr in der "Apotheke 97" in Berlin-Siemensstadt
1981, 2. Juni	3. Pharmazeutische Prüfung
1981, 27. August	Approbation als Apotheker
1981, 1. Dezember	Beginn der vorliegenden Dissertation am FB Pharmazie der FU Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K.-H. Frömming
1982, 1. April	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am FB Pharmazie der FU Berlin